



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Hodnocení stability cirkulujících nádorových
buněk a RNA v transportních zkumavkách.**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Kateřina Horáková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2020

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora:	Kateřina Horáková
Název práce:	Hodnocení stability cirkulujících nádorových buněk a RNA v transportních zkumavkách.
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce:	MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2020
Abstrakt:	<p>Tato bakalářská práce se zabývá stabilitou cirkulujících nádorových buněk a RNA v transportních zkumavkách. Cirkulující nádorové buňky se uvolňují z primárního nádoru do periferního krevního oběhu nebo lymfatického systému a účastní se procesu zakládání vzdálených metastáz. Molekuly RNA přítomné v periferním krevním oběhu poskytují obrovské množství důležitých informací o stavu pacienta. Molekuly RNA i cirkulující nádorové buňky jsou po opuštění přirozeného prostředí velmi náchylné k degradaci. Cílem této práce bylo identifikovat nejvhodnější stabilizační systém pro současnou stabilizaci RNA i cirkulujících nádorových buněk. Vzorky periferní krve byly v různých typech transportních zkumavek skladovány při pokojové teplotě po stanovenou dobu. Schopnost stabilizace RNA byla analyzována pomocí real-time PCR a schopnost stabilizace cirkulujících nádorových buněk pomocí přístroje CytoTrack.</p>
Klíčová slova:	Cirkulující nádorové buňky, RNA, transportní zkumavky, real-time PCR, CytoTrack
Počet stran:	58
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Kateřina Horáková

Title of thesis: The circulating tumor cells and RNA stability testing in the blood preservative tubes.

Type of thesis: Bachelor

Department: Laboratory of Growth Regulators

Supervisor: MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.

The year of presentation: 2020

Abstract: This bachelor thesis deals with stability of circulating tumor cells and RNA in blood preservative tubes. Circulating tumor cells are releasing from primary tumor into peripheral bloodstream or lymphatic system and participate in a process of establishing distant metastases. RNA molecules, which are present in peripheral bloodstream, are providing an immense amount of important information about the patient's condition. RNA molecules and circulating tumor cells are extremely prone to degradation after leaving their natural environment. The goal of the thesis was to identify the most suitable stabilization system for simultaneous stabilization of RNA and circulating tumor cells. Peripheral blood samples were stored in different types of blood preservative tubes at room temperature for a specified time. The ability of RNA stabilization was analyzed by real-time PCR and the ability of circulating tumor cells stabilization was analyzed by CytoTrack device.

Keywords: Circulating tumor cells, RNA, blood preservative tubes, real-time PCR, CytoTrack

Number of pages: 58

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

.....

Kateřina Horáková

Poděkování

Tato bakalářská práce byla realizována s podporou Interní grantové agentury Univerzity Palackého (IGA_LF_2020_007). Tímto bych ráda poděkovala MUDr. Josefu Srovnalovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a trpělivý přístup při zpracování mé bakalářské práce. Zároveň bych ráda poděkovala MUDr. Aloně Řehulkové za spolupráci při experimentu a Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého Olomouc (ÚMTM LF UP) za možnost vypracování bakalářské práce na jejich pracovišti.

Obsah

Seznam zkratek	8
1. Úvod	10
2. Teoretická část.....	11
2.1 CIRKULUJÍCÍ NÁDOROVÉ BUŇKY.....	11
2.1.1 Vlastnosti cirkulujících nádorových buněk	11
2.1.1.1 Fyzikální vlastnosti cirkulujících nádorových buněk	12
2.1.1.2 Exprese proteinů na buněčném povrchu	13
2.1.2 Úloha cirkulujících nádorových buněk při vzniku metastáz	13
2.1.3 Izolace a analýza cirkulujících nádorových buněk	15
2.1.3.1 CellSearch.....	15
2.1.3.2 AdnaTest.....	16
2.1.3.3 CTC čipy	16
2.1.3.4 Cytotrack	16
2.2 RNA	18
2.2.1 Kódující RNA	18
2.2.2 Nekódující RNA	18
2.2.2.1 Transferová RNA.....	19
2.2.2.2 Ribosomální RNA.....	19
2.2.2.3 MikroRNA.....	19
2.2.2.4 Malé jaderné RNA	20
2.2.2.5 Dlouhé nekódující RNA.....	20
2.2.3 Přítomnost RNA v krevní cirkulaci	21
2.2.3.1 Extracelulární vezikuly	21
2.2.3.2 Stabilita miRNA v krevní cirkulaci	22
2.2.3.3 Stabilita mRNA v krevní cirkulaci	23
2.2.4 Izolace a analýza RNA	23
2.2.4.1 Mikročipy	24
2.2.4.2 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce	24
2.3 TRANSPORTNÍ SYSTÉMY	25
2.3.1 Norgen cf-DNA/cf-RNA.....	25
2.3.2 RNAgard Blood	26
2.3.3 Cell-Free DNA BCT	26
2.3.4 Tempus Blood RNA.....	26

2.3.5	CellSave.....	27
2.3.6	EDTA zkumavky	27
2.3.7	PAXgene Blood RNA	27
2.4	SOUHRN ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	29
3.	Experimentální část	30
3.1	Testování stability RNA.....	30
3.1.1	Biologický materiál.....	30
3.1.2	Chemikálie.....	30
3.1.3	Přístrojové vybavení.....	31
3.1.4	Metody.....	32
3.1.4.1	Izolace leukocytů osmotickou lýzou erytrocytů	32
3.1.4.2	Izolace RNA TRI reagentovou metodou.....	32
3.1.4.3	Stanovení koncentrace a čistoty RNA.....	33
3.1.4.4	Reverzní transkripce.....	33
3.1.4.5	Real-time PCR	34
3.2	Testování stability cirkulujících nádorových buněk	36
3.2.1	Biologický materiál.....	36
3.2.2	Chemikálie	36
3.2.3	Přístrojové vybavení.....	36
3.2.4	Metody.....	37
3.2.4.1	Příprava vzorků.....	37
3.2.4.2	Zpracování krevního vzorku.....	37
3.2.4.3	Aplikace vzorku na CytoDisc	38
3.2.4.4	Skenování vzorku.....	38
3.3	Výsledky.....	39
3.3.1	Testování stability RNA.....	39
3.3.2	Testování stability cirkulujících nádorových buněk	42
3.4	Diskuze	45
3.5	Závěr.....	49
3.6	Použitá literatura	50

Seznam zkratek

ACTB	β -aktin
Ago2	protein argonaut-2
cDNA	komplementární jednovláknová deoxyribonukleová kyselina
CD45	tyrozin fosfatáza
CD47	protein asociovaný s integriny
CD133	prominin-1
cfDNA	cell-free deoxyribonukleová kyselina
cfRNA	cell-free ribonukleová kyselina
CTCs	cirkulující nádorové buňky (circulating tumor cells)
ctDNA	cirkulující nádorová deoxyribonukleová kyselina
DAPI	4,6-diamidin-2-fenylindol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EMT	epiteliálně mezenchymální přechod
EpCAM	molekula epiteliální buněčné adheze
EV	extracelulární vezikuly
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa
GFAP	gliální fibrilární acidický protein
HDL	lipoproteiny s vysokou hustotou
lncRNA	dlouhé nekódující ribonukleové kyseliny
MET	mezenchymálně epiteliální přechod
miRNA	mikro ribonukleová kyselina
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
pre-mRNA	prekurzorová mediátorová ribonukleová kyselina
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RISC	umlčovací komplex indukovaný RNA
RNA	ribonukleová kyselina

Rnázy	enzymy ribonukleázy
rpm	otáčky za minutu (revolutions pre minute)
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
RT-PCR	reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce
snRNA	malé jaderné ribonukleové kyseliny
tRNA	transferová ribonukleová kyselina

1. Úvod

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou stability cirkulujících nádorových buněk a RNA v transportních zkumavkách. Z periferní krve je možné získat obrovské množství buněčných a molekulárních dat, které nám podávají informace o stavu celého těla. Z tohoto důvodu je vyšetřování buněk přenášených krví tak významné pro klinickou medicínu a základní výzkum (Wong *et al.*, 2017).

Velice brzy po odběru krve začne docházet k pozvolné degradaci vzorků. Aby byla provedena co nejpřesnější analýza, je nutné zachovat patientský vzorek v minimálně změněném stavu. Transport do laboratoře, kde jsou vzorky zpracovány, může trvat i několik hodin. K tomuto účelu slouží transportní zkumavky. V dnešní době existuje mnoho variant transportních zkumavek, které obsahují různá antikoagulační a konzervační činidla jako například heparin, EDTA nebo citrát sodný, které zabraňují srážení krve a lýzi buněk.

Výrobci zkumavek u svých produktů slibují stabilizaci vzorků za různých časových a teplotních podmínek. Cílem této bakalářské práce je provést shrnutí vhodných stabilizačních systémů, otestovat stabilitu cirkulujících nádorových buněk a RNA ve vybraných transportních systémech metodami qPCR a imunofluorescence a identifikovat nejlepší systém, který by zabránil degradaci RNA a cirkulujících nádorových buněk.

První kapitola teoretické části je věnována charakteristice cirkulujících nádorových buněk, jejich koloběhu v lidském těle a metodám jejich analýzy. Ve druhé kapitole jsou popsány vybrané druhy RNA, koloběh RNA v krvi, metody izolace a analýzy RNA. Třetí kapitola obsahuje krátké informace popisující různé transportní systémy. V poslední kapitole teoretické části jsou shrnuty všechny důležité informace.

2. Teoretická část

2.1 CIRKULUJÍCÍ NÁDOROVÉ BUŇKY

Pro nádorové útvary je typické, že jsou tvořeny miliony nebo dokonce miliardami buněk. V genetické informaci těchto buněk se nachází velké množství mutací, které způsobují jejich nekontrolovatelný růst a dělení. Ne všechny buňky zůstávají během proliferace v místě primárního nádoru (Williams, 2013). Část buněk se z primárních nádorů uvolňuje a vstupuje do periferního krevního oběhu nebo lymfatického systému, díky čemuž mohou vznikat na vzdálených místech sekundární nádory tzv. metastáze (Hanahan & Weinberg, 2011). Tyto migrující buňky se nazývají cirkulující nádorové buňky (CTCs) (Alix-Panabières & Pantel, 2016).

Cirkulující nádorové buňky jsou označovány jako velice vzácné díky jejich nízké koncentraci v periferní krvi pacientů s karcinomem. U většiny z nich se v 10 ml periferní krve nachází pouze 1-10 cirkulujících nádorových buněk (Alix-Panabières & Pantel, 2014). Na jejich vzácnosti se podílí i velmi malá životnost, která se po odstranění primárního karcinomu pohybuje v rozmezí 1 - 2,4 hodiny (Meng *et al.*, 2004).

Detekce CTCs v krvi onkologických pacientů poskytuje důležité informace, které přispívají k odhalení metastatických lézí v jejich raném stádiu. Tato metoda byla označena termínem „tekutá biopsie“. Její nespornou výhodou je možnost zkoumat vlastnosti nádoru či metastatických ložisek bez nutnosti provedení biopsie, což u některých nádorů ani není možné. Vyšetření vzorku periferní krve tak zajišťuje potřebné informace o biologických vlastnostech vzdáleného ložiska. Analýza CTCs má také velký potenciál pro použití jako budoucí biomarkery odpovědi pacientů, kteří podstupují léčbu (Pantel & Alix-Panabières, 2010).

2.1.1 Vlastnosti cirkulujících nádorových buněk

Pro studium mechanismu metastáz je nezbytně nutné orientovat se v charakteristických fyzikálních a biologických vlastnostech CTCs, kterých se využívá pro jejich detekci a izolaci. Mezi fyzikální vlastnosti řadíme zejména velikost buněk, jejich plasticitu a povrchový náboj, mezi biologické pak expresi proteinů na buněčném povrchu (Yap *et al.*, 2019).

2.1.1.1 Fyzikální vlastnosti cirkulujících nádorových buněk

Velikost buněk se značně liší podle druhu nádoru, ze kterého byly buňky uvolněny. Obecně se ale pohybuje v rozmezí 9 - 19 μm v průměru (Ozkumur *et al.*, 2013). V několika málo případech byly detekovány i buňky menších velikostí, jejichž rozměry začínaly už na 4 μm (Allard *et al.*, 2004).

V roce 2015 byl proveden experiment, při kterém byly měřeny velikosti jader CTCs u pacientů bez metastáz a s metastázemi non-viscerálními a viscerálními. Buňky byly rozděleny do 3 skupin: s velkým jádrem, malým jádrem a velmi malým jádrem. U pacientů s viscerálními metastázami byly nejvíce zastoupeny CTCs s velmi malým jádrem. Dalo by se tedy obecně říct, že výskyt CTCs s velmi malým jádrem je spojen s nejagresivnější formou rakoviny (J.-F. Chen *et al.*, 2015).

Plasticita neboli schopnost přizpůsobení tvaru buňky při průniku užšími prostory patří mezi stěžejní vlastnosti CTCs. Projevuje se především během procesu zakládání metastáz, kdy se mění mechanické vlastnosti buněk, čímž dochází k větší deformaci a tím pádem i změně tvaru buněk (Rejniak, 2012). Plasticita CTCs byla měřena za použití techniky mikroskopie atomárních sil ve dvou nezávislých experimentech. Cross *et al.* (2007) zjistili, že CTCs mají až o 70% vyšší schopnost plasticity v porovnání s normálními buňkami mezotelu. C. L. Chen *et al.* (2013) studovali vzorky rakoviny prostaty a prokázali, že hodnoty plasticity CTCs izolovaných z krve se podobají hodnotám vysoce metastazující buněčné linie, jejíž hodnoty jsou 30x vyšší než hodnoty immortalizované linie prostatických buněk.

Cirkulující nádorové buňky mají v porovnání s leukocyty negativnější povrchový náboj (van der Toom *et al.*, 2016). Metoda dielektroforézy neboli DEPArray využívá těchto rozdílných elektrických vlastností pro separaci nádorových buněk ze vzorku periferní krve (Alix-Panabières & Pantel, 2014). Vzorek je umístěn ve speciální komoře, na jejímž dně se nacházejí elektrody, které vytvářejí nerovnoměrné elektrické pole. Vznikající kladnou dielektroforetickou silou jsou nádorové buňky přitahovány a zachycovány v komoře (V. Gupta *et al.*, 2012). Zachycené nádorové buňky je možné působením síly v komoře přesouvat a jednotlivé buňky lze z komory izolovat a následně analyzovat (Peeters *et al.*, 2013).

2.1.1.2 Exprese proteinů na buněčném povrchu

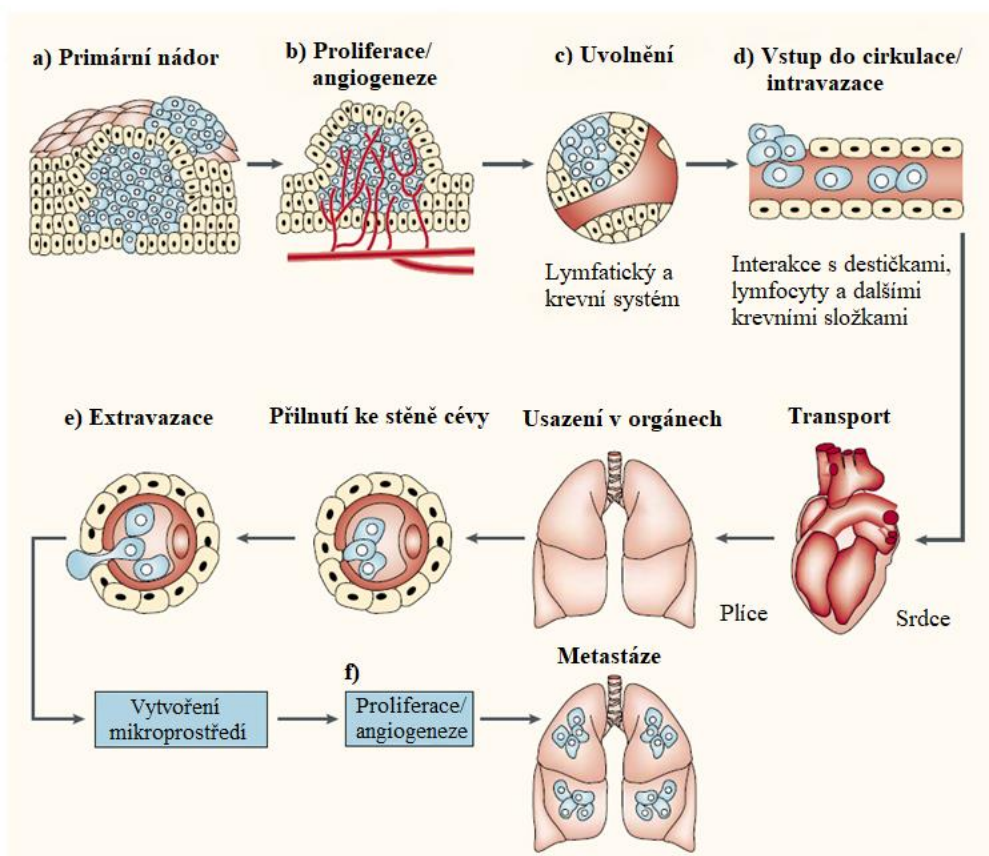
Cirkulující nádorové buňky mohou být v krvi detekovány za použití protilátek proti antigenům, které se nachází na jejich povrchu a které nelze najít u ostatních krevních buněk. Nejdůležitějším antigenem je EpCAM, který je exprimován na povrchu většiny epiteliálních buněk a u nádorových kmenových buněk dochází k jeho zvýšené expresi (Gires *et al.*, 2009; Visvader & Lindeman, 2008). Přítomnost EpCAM u primárních nádorových buněk a CTCs pravděpodobně hraje roli při aktivaci proliferace, migraci buněk a zakládání nádorů. Dříve se předpokládalo, že exprese tohoto antigenu je stálá po celou dobu vývoje nádoru (Wang *et al.*, 2017). Novější experimenty ale odhalily dynamické změny, zvláště během epiteliálně-mezenchymálního přechodu, kdy dochází k výraznému snížení exprese, což může mít za následek nepřesnou detekci CTCs ve vzorku (Gires & Stoecklein, 2014).

Mezi další antigeny lze zařadit také N-cadherin, CD133 a cytokeratiny. Tyto antigeny využili Bock *et al.* (2014), když se zabývali heterogenitou CTCs, které mohou vykazovat dediferencovaný fenotyp, což je stav, kdy se ze specializovaných diferencovaných buněk stávají opět rodičovské kmenové buňky (Stocum, 2012). Pro něj je typické, že CTCs mohou mít zároveň mezenchymální vlastnosti i vlastnosti kmenových buněk. U 19,7 % všech CTCs byla detekována exprese N-cadherinu a u 30,1 % exprese CD133. Pozoruhodné bylo zjištění, že u 57,8 % těchto CTCs byla kromě výše uvedených nalezena zároveň exprese i dalšího markeru. Tento projev koexprese může představovat důkaz pro získávání vyšší schopnosti rezistence na cílenou terapii.

2.1.2 Úloha cirkulujících nádorových buněk při vzniku metastáz

Tvorba metastáz je příčinou 90 % úmrtí pacientů s maligními tumory (G. P. Gupta & Massagué, 2006). Ač se to zdá jako pravý opak, proces vzniku metastáz je označován jako velice neefektivní, jelikož CTCs musí překonat spoustu překážek, aby se vyhnuly procesům, které by vedly k jejich eliminaci (Chambers *et al.*, 2002). Například z primárního nádoru o velikosti 1 cm se do oběhového systému může denně uvolnit až jeden milion buněk, většina z nich je ale eliminována (Fidler, 2005). Fidler (1970) vpravil do těla myši 200 000 značených nádorových buněk, z nichž pouze 78 bylo schopno vytvořit metastázy, což představuje úspěšnost u méně než 0,1 % buněk.

Prvním krokem vzniku metastáz je uvolnění nádorových buněk z primárního nádoru (viz Obr. 1) (Chambers et al., 2001), což je zajišťováno prostřednictvím epiteliálně mezenchymálního přechodu (EMT). Během EMT dochází ke snížení exprese epiteliálních proteinů (E-cadherin, occludin, cytokeratiny, claudiny) (Thiery & Sleeman, 2006) a naopak zvýšení exprese mezenchymálních proteinů (N-cadherin, vimentin) (Thiery *et al.*, 2009). Podobné změny exprese jsou pozorovány i u integrinů (Cavallo et al., 2011). Tyto změny exprese způsobují snížení adheze mezi buňkami a změny morfologie buněk prostřednictvím modifikace cytoskeletu. Procesy EMT probíhají kromě nádorových buněk také i během embryonálního vývoje, hojení ran a fibrózy (Nieto *et al.*, 2016).



Obr. 1: The main steps in the formation of a metastasis (převzato a upraveno z Fidler, 2003)

U normálních epitelových buněk vyvolává ztráta adheze speciální typ buněčné smrti označované jako anoikis. Nádorové buňky vykazují schopnost rezistence, která jim umožňuje přežít mimo prostředí primárního nádoru a šířit se po celém těle (Y.-N. Kim et al., 2012). Po uvolnění z primárního nádoru buňky vstupují do krevní cirkulace nebo lymfatického systému v procesu, který je označován jako intravazace (Chambers et al., 2001). V krevní cirkulaci se často spojují do shluků o více než 3 buňkách. Ve vzorcích krve se pak CTCs mohou nacházet buď jednotlivě, nebo v těchto klastrech. Bylo prokázáno, že

klastry mohou mít až 50x zvýšený metastatický potenciál v porovnání s jednotlivými CTCs (Cayrefourcq & Alix-Panabières, 2019). Během šíření krví musí CTCs ještě odolávat buňkám imunitního systému. K tomuto účelu využívají např. pokrytí povrchu krevními destičkami, které pak slouží jako obranný štít (Lou *et al.*, 2015). U buněk kolorektálního karcinomu byla pozorována zvýšená exprese proteinu CD47 (Steinert *et al.*, 2014), který je označován jako „don't eat me“ signál pro makrofágy a dendritické buňky (Jaiswal *et al.*, 2009).

Většina CTCs prochází krevní cirkulací a zastaví se až v místě, které je pro jejich průchod příliš malé (Chambers *et al.*, 2001). Zde dochází i k výše zmíněné deformaci. Odtud poté opouštějí síť kapilár a vstupují do stromatu hostitelského orgánu. Tento proces je označován jako extravazace (Schilling *et al.*, 2012). Zastavení migrace je způsobeno mezenchymálně epiteliálním přechodem (MET), během kterého dochází k opačným procesům než u EMT (Thiery *et al.*, 2009). Vznik metastáz na vzdálených místech od primárního nádoru je vysvětlován 3 mechanismy (Woodhouse *et al.*, 1997). Všechny 3 mechanismy se opírají o teorii, že metastáze mohou vzniknout pouze, pokud CTCs vykazují specifickou afinitu k cílovému orgánu (Fidler, 2003). Pro úspěšné dokončení metastatického procesu musí dojít k zahájení proliferace. Růst metastáz je pak udržován tvorbou nových krevních cév (Chambers *et al.*, 2002).

2.1.3 Izolace a analýza cirkulujících nádorových buněk

Metody izolace a analýzy CTCs vyžadují vysokou specifitu a citlivost (Pantel & Alix-Panabières, 2010). Způsoby izolace mohou být na základě selektivity rozděleny do 3 kategorií. Pozitivní selekce využívá pro izolaci jedinečné vlastnosti, kterými se CTCs odlišují od zbytku krevních buněk. Negativní selekce je založena na odstranění buněk s vlastnostmi leukocytů a dalších krevních buněk. Metody bez selekce představují vysoce výkonné zobrazovací a objemové metody, které pro detekci nevyužívají ani pozitivní ani negativní selekci (van der Toom *et al.*, 2016).

2.1.3.1 CellSearch

System CellSearch je v současnosti jedna z nejpoužívanějších metod pro izolaci CTCs a zároveň je jako jediná schválená agenturou FDA (Food and Drug Administration – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, USA) pro klinické použití u pacientů s rakovinou prsu, prostaty a tlustého střeva (Yap *et al.*, 2019). Vzorky krve jsou odebírány do speciálních zkumavek. Po

oddělení pevných složek krve od plazmy jsou CTCs separovány za použití ferrofluidních nanočástic s navázanými protilátkami proti EpCAM a poté jsou CTCs označeny monoklonálními protilátkami proti cytokeratinům. Následně dochází k identifikaci kontaminujících leukocytů za použití protilátek proti CD45 a na navázané CTCs a leukocyty je aplikováno fluorescenční barvivo DAPI neboli 4,6-diamidin-2-fenylindol, které zvýrazní jádra buněk. Buňky v takto zpracovaných vzorcích jsou v magnetické komoře rozděleny magnetickou silou a jsou dále analyzovány (<http://www.cellsearchctc.com/>). Buňky označené jako CTCs by měly být pozitivní pro EpCAM, DAPI a cytokeratiny a negativní pro CD45 (L. Wang *et al.*, 2016).

2.1.3.2 AdnaTest

AdnaTest je metoda, která k izolaci nádorových buněk využívá techniku pozitivní selekce s navazující reverzně transkriptázovou polymerázovou řetězovou reakcí (RT-PCR) (Yap *et al.*, 2019). Ke vzorku periferní krve jsou přidány magnetické kuličky potažené různou kombinací protilátek, které vykazují vysokou specifitu k antigenům na povrchu nádorových buněk. Značené buňky jsou poté za pomoci magnetu separovány, čištěny a lyzovány, aby došlo k uvolnění mRNA. Získaná mRNA je reverzní transkripcí převedena na cDNA, která je následně analyzována prostřednictvím RT-PCR. Výrobce slibuje velmi vysokou specifitu a detekční limit dvou CTCs v 5 ml krve (<https://www.qiagen.com/au/>).

2.1.3.3 CTC čipy

Tato technika využívá křemíkové mikročipy o velikosti mikroskopického sklíčka se speciální strukturou na povrchu, která obsahuje navázané protilátky proti EpCAM. Vzorek plné krve je proháněn přes mikročip, čímž dochází k zachycení CTCs na protilátky. Navázané buňky mohou být poté barveny pro odlišení od leukocytů, počítány a analyzovány (Sequist *et al.*, 2009). Díky prakticky nulové úpravě vzorku před jeho analýzou a minimalizaci buněčného stresu zůstává 98 % izolovaných CTCs životaschopných, což je klíčové pro jejich další analýzu (Nagrath *et al.*, 2007).

2.1.3.4 Cytotrack

Technologie Cytotrack je poměrně nová metoda, která pro izolaci CTCs kombinuje vlastnosti průtokové cytometrie a skenovací mikroskopie. Vzorek je nanášen na speciální skleněný disk o velikosti CD/DVD, díky čemuž se v jedné tenké vrstvě může nacházet až

100 milionů buněk. Díky extrémně vysoké skenovací kapacitě není nutné vzorek před zpracováním upravovat magnetickou separací za pomoci protilátek nebo filtrací na základě velikosti buněk, což je typické pro většinu běžně používaných technik. Skleněný disk je vysokou rychlostí otáčen a povrch disku je skenován laserovým systémem. Přístroj po vyhodnocení dat zaznamená polohy jednotlivých CTCs na disku a následuje druhé skenování pro ověření správnosti získaných výsledků. Po dokončení identifikace mohou být jednotlivé buňky izolovány z disku do zkumavky nebo na sklíčko pro další analýzu jako např. PCR (<http://www.cytotrack.com/>).

2.2 RNA

Ribonukleová kyselina neboli RNA je lineární polymer, který je tvořen opakujícími se nukleotidy, které jsou mezi sebou propojeny fosfodiesterovou vazbou. Jednotlivé nukleotidy se skládají ze 3 komponent: zbytek kyseliny fosforečné, tzv. fosfátová skupina, pětiuhlíkatý monosacharid (pentóza) a dusíkatá heterocyklická báze. Sacharidovou složku představuje β -D-ribóza. Mezi dusíkaté báze vyskytující se v RNA řadíme adenin, guanin, cytosin a uracil. Molekula RNA se většinou nachází jako jednovláknová. Přesto jsou známy případy, kdy dochází k párování bází, což vede ke tvorbě různých dvouvláknových struktur. Podle toho, zda RNA obsahuje sekvenci kódující protein, rozdělujeme RNA na kódující a nekódující (Snustad *et al.*, 2017; Kodíček *et al.*, 2018).

2.2.1 Kódující RNA

Molekula RNA, která nese informaci o primární struktuře peptidu nebo proteinu, se nazývá mediátorová RNA (mRNA). Její syntéza probíhá v buněčném jádře procesem transkripce, kdy za katalýzy enzymem RNA-polymerázou II a účasti dalších proteinů vzniká vlákno pre-mRNA, které je komplementární k úseku DNA obsahující daný gen. Vlákno pre-mRNA je dále upravováno polyadenylací, přidáním 7-methylguanosinu a sestřihem, kdy jsou odstraňovány nekódující sekvence (introny). Tímto je získána finální mRNA. Ta je transportována přes jaderné póry do cytoplasmy k ribozomům, kde slouží jako templát pro syntézu proteinů v procesu translace (Snustad *et al.*, 2017).

2.2.2 Nekódující RNA

Nekódující RNA představuje velkou rozmanitou skupinu molekul, které sice nenesou informaci o struktuře proteinů, ale některé jsou klíčové pro jejich syntézu. Mnoho z nich se účastní regulace genové exprese, ale figurují také při vývoji různých onemocnění (Snustad *et al.*, 2017; Iaconetti *et al.*, 2013). Nekódující RNA zaujímají přibližně 93-97 % celkové hmotnosti RNA v jedné savčí somatické buňce, ve které se nachází asi 10^7 molekul RNA (Palazzo & Lee, 2015).

Genové exprese se kromě mRNA účastní také tRNA, rRNA, snRNA, miRNA a lncRNA. Všechny tyto molekuly jsou syntetizovány v buněčném jádře procesem transkripce. Zatímco mRNA slouží jako prostředník pro následnou syntézu proteinů, syntéza

zbylých 5 typů molekul je transkripce ukončena a po posttranskripčních úpravách k translaci v jejich případě již nedochází (Snustad *et al.*, 2017).

2.2.2.1 Transferová RNA

Transferová RNA (tRNA) je druhá nejhojněji zastoupená nekódující RNA. Představuje 10 - 15 % celkové hmotnosti molekul RNA v buňce (Palazzo & Lee, 2015). Její syntéza je katalyzována RNA-polymerázou III (Snustad *et al.*, 2017). Vlákno tRNA je dlouhé 73-93 nukleotidů a vytváří typickou sekundární strukturu připomínající jetelový list, který je tvořen čtyřmi helikálními úseky stabilizovanými vodíkovými můstky a třemi vlásenkami. Vlákno dále vytváří i terciární strukturu ve tvaru písmene L. Typickým jevem je u tRNA výskyt modifikovaných bazí (Kodíček *et al.*, 2018).

Molekula tRNA plní nepostradatelnou funkci při translaci, kdy na svůj 3' konec váže esterovou vazbou odpovídající aminokyselinu, kterou přináší k ribozomu. V ribozomu se poté váže na kodon na mRNA pomocí komplementární sekvence (antikodonu), který se nachází v jedné z vlásenek (Kodíček *et al.*, 2018).

2.2.2.2 Ribosomální RNA

Ribosomální RNA (rRNA) je nukleová kyselina, která spolu s dalšími proteiny vytváří ribozomy. V lidské buňce zaujímá 80-90 % celkové hmotnosti molekul RNA (Palazzo & Lee, 2015). Ribozom je vysoce konzervovaná ribonukleoproteinová částice, která katalyzuje finální krok syntézy proteinů (translaci). Při translaci je informace z mRNA překládána do podoby proteinu podle pravidel genetického kódu. Každý ribozom se skládá ze dvou podjednotek (malá a velká), které jsou kromě ribosomálních proteinů tvořeny různými druhy rRNA, které se od sebe liší Svedbergovým sedimentačním koeficientem (S). U eukaryot je malá podjednotka tvořena 18S rRNA a velká podjednotka 28S; 5,8S a 5S rRNA. Samotné rRNA jsou u eukaryot syntetizovány v buněčném jádru. Enzym RNA-polymeráza I katalyzuje transkripci všech rRNA kromě 5S, jejíž transkripci katalyzuje RNA-polymeráza III (Kodíček *et al.*, 2018; Woolford & Baserga, 2013).

2.2.2.3 MikroRNA

MikroRNA (miRNA) patří do skupiny malých nekódujících RNA. Jsou to jednovláknové molekuly dlouhé 18-24 nukleotidů, jejichž hlavní funkcí je regulace genové exprese. V lidském genomu se nachází minimálně 326 genů kódující miRNA, takže se jedná o velmi

rozmanitou a početnou skupinu (Carthew, 2006; Pös *et al.*, 2018). Syntéza miRNA probíhá v buněčném jádře za katalýzy RNA-polymerázou II, čímž se získává vlákno se strukturou vlásenky. Vlásenka je upravována nejprve enzymem Drosha a po transportu do cytoplazmy enzymem Dicer. Poté dochází k degradaci jednoho vlákna vlásenky a zbylé vlákno se stává součástí umlčovacího komplexu RISC (RNA induced silencing complex) (Cai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004). Komplex RISC se pomocí miRNA, která je komplementární k části určité mRNA, na mRNA naváže a znemožňuje tak translaci (Mattick & Makunin, 2006). Bylo prokázáno, že miRNA ovlivňuje nádorové procesy regulací apoptózy, buněčné proliferace a EMT (Schwarzenbach *et al.*, 2011).

2.2.2.4 Malé jaderné RNA

Malé jaderné RNA (snRNA) představují malou skupinu nekódujících RNA, které se nachází v nukleoplazmě. Jejich syntéza je katalyzována RNA-polymerázou II a III (Hernandez, 2001). Molekuly snRNA bohaté na uridin vytváří spolu s dalšími mnoha proteiny ribonukleoproteinovou částici označovanou jako spliceozom. Lidský spliceozom je složen z 5 různých snRNA a přibližně 150 proteinů. Spliceozom provádí sestřih a odstranění intronů z vlákna pre-mRNA při posttranskripčních úpravách. Narušení sestřihu nebo sestavení spliceozomu byly pozorovány u několika genetických onemocnění jako Spinální svalová dystrofie, Dyskeratosis congenita nebo Praderův-Williho syndrom (Matera *et al.*, 2007; Valadkhan, 2010; Wahl *et al.*, 2009).

2.2.2.5 Dlouhé nekódující RNA

Dlouhé nekódující RNA (lncRNA) je skupina nekódujících RNA, jejichž délka přesahuje 200 nukleotidů. Většina lncRNA je u člověka syntetizována za katalýzy RNA-polymerázou II (Rao, 2017). V savčí buňce se nachází asi 53 000 různých lncRNA, které zaujmají pouze 0,03-0,2 % hmotnosti všech molekul RNA v buňce (Palazzo & Lee, 2015). Nejprve se díky jejich poměrně nízké expresi předpokládalo, že tyto dlouhé nekódující transkripty jsou bezvýznamné a představují pouze „transkripční šum“ (Morris & Mattick, 2014). Dnes už je ale jasné, že část z nich plní důležité funkce v různých biologických procesech. Významně se podílejí na regulaci genové exprese na transkripční a posttranskripční úrovni. Podobně jako miRNA také ovlivňují nádorové procesy regulací apoptózy, vzniku metastáz a rezistence na léčiva (Ma *et al.*, 2017; Rao, 2017; Zhou *et al.*, 2018).

2.2.3 Přítomnost RNA v krevní cirkulaci

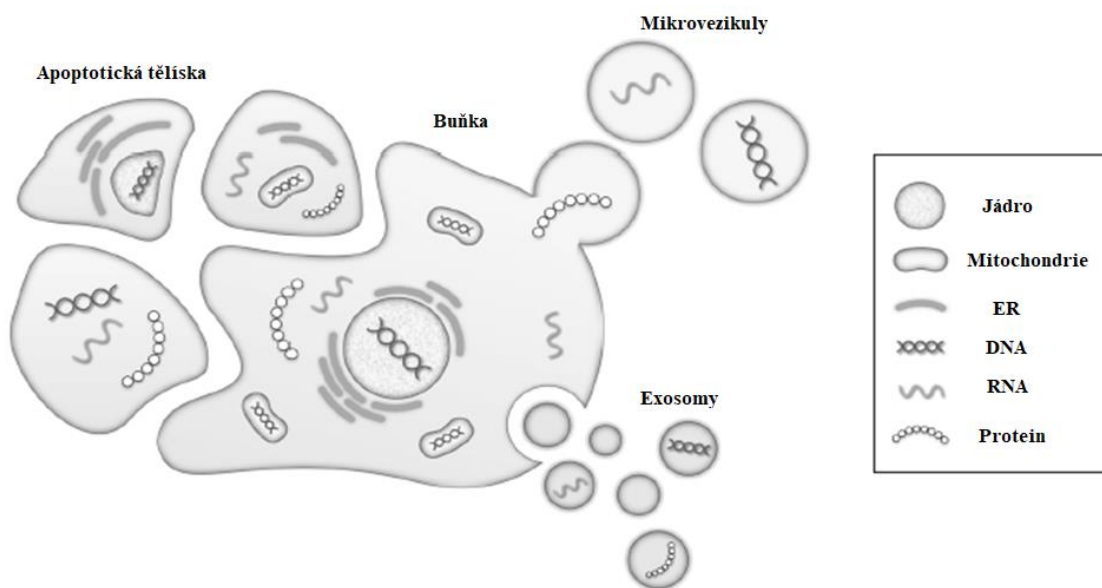
Metodou tekuté biopsie lze v krevní plazmě kromě CTCs analyzovat také nukleové kyseliny. Ty jsou v krevní cirkulaci přítomny v několika formách. Nacházejí se uvnitř buněk, ale byly nalezeny i u buněk, které jádra nemají. Do periferní krve mohou být uvolňovány apoptózou, nekrotózou anebo mohou být vylučovány mitochondriemi. Zde mohou být poté přenášeny uvnitř extracelulárních vezikul nebo mohou vytvářet ribonukleoproteinové komplexy. Pokud se však molekuly RNA vyskytují v krevní cirkulaci ve volném stavu, jsou označovány jako cell-free RNA (cfRNA) (Schwarzenbach *et al.*, 2011; Yáñez-Mó *et al.*, 2015).

Molekuly RNA jsou většinou méně stabilní oproti DNA a náchylné k degradaci prostřednictvím enzymů ribonukleáz (RNáz) (Souza *et al.*, 2017). Ty jsou velice rozšířené a velmi odolné. Mohou se nacházet například ve vodě, laboratorních pufrech, na rukou a hlavně v tělních tekutinách (Tzimagiorgis *et al.*, 2011).

2.2.3.1 Extracelulární vezikuly

Extracelulární vezikuly (EV) jsou membránové útvary uvolňované buňkami, které zprostředkovávají mezibuněčnou komunikaci. Tu zajišťují přenášením různých biomolekul. Kromě nukleových kyselin mohou přenášet i proteiny, lipidy a sacharidy. Podle velikosti a způsobu vzniku se dělí na exosomy, mikrovezikuly a apoptotická tělíska (viz. Obr. 2) (Yáñez-Mó *et al.*, 2015).

Exosomy představují skupinu nejmenších EV (40-100 nm). Vchlípením buněčné membrány dovnitř buňky vznikají intracelulární vezikuly, které se shromažďují do multivesikulárních částic. Ty jsou poté obaleny buněčnou membránou a exocytózou opouštějí buňku. Mikrovezikuly jsou větší než exosomy (0,1-1 μm). Z buněk se uvolňují také exocytózou, takže vždy nesou obsah a povrchové proteiny původní buňky. Tvorba mikrovezikul byla pozorována u velkého množství buněk jako například endoteliální buňky, krevní elementy, kardiomyocyty i nádorové buňky. Apoptotická tělíska vznikají z fragmentů buňky, u které byla vyvolána apoptóza. Jsou mnohem větší než ostatní EV (1-5 μm) a mohou nést části jádra, membrán, cytosolový obsah a dokonce organely původní buňky (Burger *et al.*, 2013).



Obr. 2: Vznik extracelulárních membránových vezikul (EV) (převzato a upraveno z Pös *et al.*, 2018)

2.2.3.2 Stabilita miRNA v krevní cirkulaci

V periferní krvi jsou miRNA jako jedny z mála RNA vysoce stabilní (Schwarzenbach *et al.*, 2011). Málokdy se totiž po uvolnění z buňky nachází ve volném stavu. Nejprve se předpokládalo, že jejich odolnost je způsobena pouze přítomností uvnitř exosomů. Arroyo *et al.* (2011) ale zjistili, že pouze 10 % miRNA v krevním oběhu se nachází uvnitř EV a 90 % potom v komplexu RISC s proteinem Ago2. Předpokládají, že tendence miRNA spojovat se Ago2 nebo exosomy je dána původem buňky, ze které miRNA pochází. Turchinovich *et al.* (2011) ve svém experimentu detekovali dokonce více jak 97 % miRNA, které nejsou asociovány s exosomy. Zjistili, že komplex miRNA/Ago2 je stabilní i po 2 měsících ve formě buněčného lyzátu a že miRNA může tvořit komplexy i s dalšími proteiny z rodiny Argonaut (zejména Ago1, Ago3 a Ago4).

Kromě exosomů a komplexů s proteiny byly miRNA nalezeny i ve spojení s lipoproteiny s vysokou hustotou (HDL – high density lipoproteins), které jim poskytují ochranu před působením RNáz a pravděpodobně slouží také jako transportéry k cílovým místům, kde má dojít k regulaci genové exprese (Vickers *et al.*, 2011). Díky velmi vysoké stabilitě v krevním oběhu by mohly specifické miRNA sloužit jako biomarkery pro časně odhalení nejen nádorových onemocnění (Arroyo *et al.*, 2011). Také je zvažována možnost

použití syntetických miRNA pro umlčování genů, které aktivují různá onemocnění (Suckau *et al.*, 2009).

2.2.3.3 Stabilita mRNA v krevní cirkulaci

Molekuly mRNA jsou velmi rozmanité a bohužel velmi náchylné k degradaci, takže se v krevní plazmě a séru často nachází jen jejich fragmenty. Z tohoto důvodu se většina studií zaměřuje spíše na analýzu miRNA a jejich výskyt v krevní cirkulaci je také více objasněn (Schwarzenbach *et al.*, 2011; Shih *et al.*, 2015). Nicméně bylo potvrzeno, že mRNA se mohou nacházet uvnitř EV a především uvnitř exosomů (K. M. Kim *et al.*, 2017).

Valadi *et al.* (2007) izolovali exosomy z myší linie žírných buněk a v nich pomocí mikročipů detekovali 1300 různých mRNA. Pozoruhodný byl nález 270 genových transkriptů, které se nenacházely v původních buňkách, ale pouze v exosomech. Provedením *in vitro* translačního testu dokázali, že mRNA v exosomech jsou neporušené a v cílových buňkách mohou být translací přeměňovány na proteiny. Jelikož molekuly mRNA umožňují detekovat, které geny jsou v daném stavu pacienta exprimovány, představují, i navzdory jejich nestálosti, ideální biomarkery pro neinvazivní sledování průběhu nádorového onemocnění a také jeho včasné odhalení (Schwarzenbach *et al.*, 2011).

2.2.4 Izolace a analýza RNA

Nejdůležitější zásadou při izolaci RNA je pracovat ve vysoce sterilním prostředí, aby se zamezilo kontaminaci vzorku RNázami. Po provedení izolace je nutné udržovat vzorky v chladu, aby nedocházelo k degradaci (Tuffaha, 2008). Nejčastější metodou pro izolaci RNA je v současnosti extrakce činidlem obsahující guanidinium thiokyanát a fenol. Umožňuje současnou a poměrně rychlou izolaci RNA, DNA i proteinů z jednoho vzorku. Je známá již řadu let, ale poskytuje vysoké výtěžky i čistotu izolované RNA (Chomczynski, 1993). Mezi další přístupy se pak řadí adsorpce molekul RNA na silica membránu, která se nachází uvnitř kolonek, a izolace pomocí magnetických nanočástic s následnou separací pomocí magnetického pole (Farrell, 2017; Magnani *et al.*, 2006).

Před analýzou získané RNA je potřeba provést kontrolu integrity a čistoty a stanovit její koncentraci ve vzorku. Kontrolu integrity je možné provést tradičně pomocí elektroforézy nebo pomocí PCR za použití kontrolních genů (např. β -aktin, GAPDH – glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa) (Liu, 2005; Tzimagiorgis *et al.*, 2011). Koncentraci a čistotu je možné stanovit pomocí UV/VIS spektrofotometrie. Molekuly mRNA a miRNA

mohou být analyzovány mnoha způsoby. Jednou ze složitějších metod je sekvenování nové generace, které vyžaduje přípravu sekvenční knihovny a následné četné úpravy. Mezi jednodušší metody pak patří analýza pomocí mikročipů (microarray) a kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR) (Etheridge *et al.*, 2013; Stark *et al.*, 2019).

2.2.4.1 Mikročipy

Analýza genové exprese pomocí mikročipů je relativně rozšířená metoda. Umožňuje detekovat expresi tisíců molekul RNA najednou. Používají se například pro sledování změn genové exprese u zdravých a nemocných buněk, v průběhu buněčného cyklu nebo během embryonálního vývoje. Jedná se o skleněné nebo silikonové destičky, na jejichž povrchu jsou navázány tisíce jednovláknových DNA sond ve formě cDNA nebo oligonukleotidů. Studované mRNA jsou převedeny na cDNA reverzní transkripcí a poté je provedena polymerázová řetězová reakce (PCR). Získané cDNA označené fluorescenční značkou jsou nanášeny na mikročip. Navázané cDNA jsou analyzovány pomocí laseru a detektoru fluorescence. Pozitivní signál pak potvrzuje, že konkrétní mRNA, která sloužila pro syntézu cDNA, byla přítomna v buňce (Gershon, 2002; Snustad *et al.*, 2017).

2.2.4.2 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR) někdy také označovaná jako PCR v reálném čase (real-time PCR) je velice citlivá a přesná metoda. Oproti klasické PCR umožňuje kvantifikaci vznikajících produktů v reálném čase (Singh & Roy-Chowdhuri, 2016). Pro analýzu mRNA a miRNA jsou vzorky převedeny reverzní transkripcí do podoby cDNA, která je poté označena fluorescenční sondou nebo barvivem. Následně jsou vzorky vloženy do přístroje (termocykleru), kde probíhá samotná qPCR analýza. Termocykler v průběhu reakce provádí měření vzrůstající fluorescence, která je přímo úměrná narůstajícímu množství cDNA. Reverzní transkripci a qPCR je možné provádět buď odděleně, nebo zároveň, kdy jsou potom do zkumavky přidány komponenty pro obě reakce. Reakce „v jedné zkumavce“ snižuje riziko kontaminace, ale neumožňuje uchování syntetizované cDNA (Nolan *et al.*, 2006). Metoda qPCR se obdobně jako u mikročipů používá pro sledování změn genové exprese a je velice oblíbená při studiu nádorových onemocnění (Singh & Roy-Chowdhuri, 2016; Tzimagiorgis *et al.*, 2011)

2.3 TRANSPORTNÍ SYSTÉMY

Nejdůležitějším a nejvíce problémovým prvkem tekuté biopsie je zachování původního stavu patientského vzorku během transportu a následného uskladnění před zpracováním. Po odběru krve může docházet ke změnám exprese mRNA a apoptóze CTCs (Das *et al.*, 2014; Meng *et al.*, 2004). Ideální transportní systém pro nukleové kyseliny by měl zabránit degradaci buněk přenášených krví, jejichž rozpad by způsobil uvolnění nukleových kyselin do krevní plazmy. Zároveň by také měl zamezit degradaci mimobuněčných nukleových kyselin, které se již nacházely v krevním oběhu pacienta (Kang *et al.*, 2016). V dnešní době existuje mnoho variant transportních zkumavek od různých výrobců, které poskytují rozdílné časové a teplotní podmínky pro stabilizaci (Tab. 1). Některé stabilizují pouze RNA, jiné pouze CTCs. Existují i systémy, které jsou schopny stabilizovat obojí.

Tab. 1: Podmínky stabilizace RNA a CTCs ve vybraných transportních zkumavkách

	Transportní zkumavky	Počet dní	Teplota (°C)	Objem plné krve (ml)
RNA / DNA	Norgen cf-DNA/cf-RNA	30	15-25	8.4
	RNAgard Blood	14	15-25	2.5
	Cell-Free DNA BCT Streck	14	6-37	10
	Tempus Blood RNA	5	18-25	3
	EDTA Vacuette	3	15-25	2-10
	PAXgene Blood RNA	3	18-25	2.5
CTCs	Norgen cf-DNA/cf-RNA	14	15-25	8.4
	Cell-Free DNA BCT Streck	7	15-30	10
	CellSave	4	15-25	10

2.3.1 Norgen cf-DNA/cf-RNA

Transportní zkumavky Norgen cf-DNA/cf-RNA jsou výrobkem kanadské firmy Norgen Biotek Corporation. Jako jedny z mála zajišťují současnou stabilitu cfDNA, cfRNA i CTCs ve vzorcích lidské plné krve. Výrobce udává, že cfRNA je stabilní po dobu 30 dní a CTCs po dobu 14 dní skladování při pokojové teplotě (15-25 °C) (<https://norgenbiotek.com/>). Velmi dobré podmínky stabilizace zajišťuje ochranné činidlo, které se skládá z polyethylenglykolu (polymer, vytlačuje buňky z roztoku), chloridu sodného (penetrační činidlo, vytváří hypertonický roztok), EDTA (inhibitor enzymů) a azidu sodného (metabolický inhibitor) (Haj-Ahmad & Haj-Ahmad, 2019). Izolované a purifikované nukleové kyseliny mohou být následně analyzovány jakýmkoliv způsobem. Jejich použití je ale schváleno pouze pro vědecké účely (<https://norgenbiotek.com/>).

2.3.2 RNAgard Blood

Zkumavky RNAgard Blood vyrábí americká firma Biomatrix. Jsou určeny pro stabilizaci buněčných DNA a RNA ve vzorcích plné krve. Molekuly RNA by měly zůstat neporušené po dobu 14 dní skladování při pokojové teplotě nebo po dobu 1 měsíce při 4 °C. Kvalita i kvantita izolovaných RNA by měla být velmi vysoká. Izolované nukleové kyseliny jsou vhodné pro široké spektrum analýz, ale opět není povoleno jejich použití v diagnostice (<https://www.biomatrix.com/>).

2.3.3 Cell-Free DNA BCT

Cell-Free DNA BCT zkumavky produkuje americká firma Streck Corporate, která se technologií stabilizace buněk zabývá již od roku 1971. Zkumavky předcházejí úniku genomické DNA z buněk, čímž zajišťují vysoce kvalitní izolovanou cfDNA i po 14 dnech skladování při 6-37 °C (<https://www.streck.com/>). Pro stabilizaci nukleových kyselin využívá firma Streck ochranné činidlo, které mimo jiné obsahuje kyselinu aurintrikarboxylovou (inhibitor nukleáz), diazolidinyl ureu (konzervační látka) a kombinaci metabolických inhibitorů: glycerinaldehyd, fluorid sodný a EDTA (Fernando, 2013). Schopnosti stabilizace byly testovány i pro CTCs, které zůstávaly neporušené až 7 dní při teplotách 15-30 °C (<https://www.streck.com/>). Pro stabilizaci CTCs je využíváno ochranné činidlo obsahující mimo jiné imidazolidinyl ureu, EDTA, glycin a beta-merkapt ethanol (Hunsley *et al.*, 2018). Zkumavky bývají běžně využívány v klinických výzkumných studiích, při identifikaci léčiv a vývoji diagnostických testů (<https://www.streck.com/>).

2.3.4 Tempus Blood RNA

Transportní zkumavky Tempus Blood RNA jsou určeny pro stabilizaci a následnou izolaci celkové RNA ze vzorků plné krve. Výrobcem je americká firma Thermo Fisher Scientific. Zkumavky udržují RNA stabilní během skladování při pokojové teplotě (18-25 °C) po dobu až 5 dní nebo při 4 °C po dobu minimálně 1 týdne. Vzorky je možné uchovávat i na delší dobu v mrazáku. Uvnitř zkumavek se nachází 6 ml stabilizačního činidla (<https://www.thermofisher.com/cz/en/home.html>), které se skládá z guanidin thiokyanátu nebo guanidin hydrochloridu (chaotropní sůl), Tweenu 20 (detergent) a ethanolu (srážedlo) (Moring & Somack, 1999). Po odběru krve činidlo způsobuje okamžitou lýzu krevních buněk, inaktivaci RNáz a selektivní precipitaci molekul RNA, zatímco genomická DNA a

proteiny zůstávají v roztoku. Izolovanou RNA je možné analyzovat například pomocí real-time PCR nebo mikročipů (<https://www.thermofisher.com/cz/en/home.html>).

2.3.5 CellSave

Zkumavky CellSave jsou součástí systému CellSearch, který je, jak je uvedeno v kapitole 2.1.3.1, jako jediný schválen pro klinické použití agenturou FDA. Kombinace Na₂EDTA a dalších buněčných konzervačních činidel uvnitř zkumavky by měly zachovat neporušené CTCs po dobu až 4 dnů skladování při pokojové teplotě (Yap *et al.*, 2019; <https://www.cellsearchctc.com/>). Přestože jsou zkumavky CellSave primárně určeny pro stabilizaci CTCs, byla testována i možnost jejich použití pro analýzu cirkulující nádorové DNA (ctDNA), což by umožňovalo současnou analýzu CTCs a ctDNA z jednoho vzorku (Kang *et al.*, 2016).

2.3.6 EDTA zkumavky

Systém odběrových zkumavek Vacuette zahrnuje velké množství zkumavek pro všemožná vyšetření a stanovení. Pravděpodobně nejčastěji používanou variantou jsou zkumavky obsahující jako antikoagulační činidlo K₂EDTA nebo K₃EDTA. Pro molekulárně biologické vyšetření může být zkumavka doplněna ještě o gel (<https://www.dialab.cz/>). Zkumavky by měly udržet molekuly RNA ve vzorku plné krve stabilní po dobu alespoň 3 dnů při laboratorní teplotě (Banfi *et al.*, 2007). V současnosti jsou ale prováděny experimenty, při kterých jsou porovnávány schopnosti stabilizace těchto „tradičních“ zkumavek a novějších variant. Ve většině případů jsou za daných podmínek výsledky stabilizace RNA v K₂EDTA/K₃EDTA zkumavkách nevyhovující (Das *et al.*, 2014; Feddersen *et al.*, 2016).

2.3.7 PAXgene Blood RNA

PAXgene Blood RNA zkumavky jsou spolu se stejnojmenným kitem pro purifikaci nukleových kyselin součástí PAXgene Blood RNA systému, který slouží ke stabilizaci intracelulární RNA ve vzorcích plné krve. Výrobce je švýcarská firma PreAnalytiX, která je v současné době součástí firmy Qiagen. Uvnitř zkumavek se nachází stabilizační činidlo, které stejně jako u Tempus Blood RNA zkumavek způsobuje lýzu krevních buněk, čímž údajně usnadňuje následnou purifikaci RNA (<https://www.preanalytix.com>). Činidlo by mělo obsahovat z uveřejněných chemikálií guanidinium isokyanát nebo guanidinium hydrochlorid (chaotropní sůl), placentární inhibitor ribonukleáz,

tetradecyltrimethylamonium oxalát, kyselinu vinnou a dodecylsírán sodný nebo Tween 20 (detergent) (Augello *et al.*, 2003). Výrobce udává, že RNA zůstane stabilní po dobu 3 dní skladování při pokojové teplotě, 5 dní při 2-8 °C, 6 měsíců při -20 °C a 12 měsíců při -70 °C. Vysoce kvalitní izolovaná RNA je poté vhodná pro široké spektrum analýz. Použití zkumavek je povoleno pouze pro vědecké účely, často například pro testování léčiv (<https://www.preanalytix.com>).

2.4 SOUHRN ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Koncept tekuté biopsie představuje velký pokrok nejenom v oblasti onkologie. Kromě včasného odhalení nádorových ložisek umožňuje také analyzovat změny hladin nukleových kyselin přítomných v krevní cirkulaci během přirozeného průběhu onemocnění. Sledování odpovědi na probíhající léčbu navíc dovoluje poskytovat individuální podmínky terapie podle potřeby konkrétního pacienta (Cayrefourcq & Alix-Panabières, 2019; Schwarzenbach *et al.*, 2011).

Doposud nebyl identifikován žádný naprosto spolehlivý a zároveň jedinečný biomarker pro identifikaci nádorových onemocnění. Z toho důvodu jsou používány různé kombinace cirkulujících biomarkerů (Cayrefourcq & Alix-Panabières, 2019). Řada z nich je velice nestálá (CTCs, mRNA). Aby byly zajištěny co nejpřesnější výsledky vyšetření, nemělo by v časovém rozmezí mezi odběrem vzorku a jeho zpracováním docházet k žádným změnám.

V předešlé kapitole bylo popsáno několik vhodných transportních systémů, které byly uspořádány podle časových podmínek stabilizace RNA a CTCs. Nejlepším kandidátem se zdají být zkumavky Norgen cf-DNA/cf-RNA, které dle výrobce stabilizují nukleové kyseliny až 30 dní a CTCs až 14 dní.

V experimentální části bude provedeno posouzení jednotlivých typů transportních zkumavek pro možnosti tekuté biopsie a paralelních analýz cfDNA a CTCs.

3. Experimentální část

3.1 Testování stability RNA

3.1.1 Biologický materiál

Pro izolaci RNA byly použity vzorky periferní krve, které byly odebrány pěti dobrovolným dárcům na pracovišti Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého Olomouc (ÚMTM LF UP) do tří různých odběrových zkumavek: K₃EDTA (Vacuette, Greiner Bio-One), CellSave (Menarini-Silicon Biosystems), Cell-Free DNA BCT (Streck). Odběr byl proveden u každého dobrovolníka do každého typu zkumavky ve třech kopiích. Vzorky byly poté skladovány při laboratorní teplotě po dobu 24 a 72 hodin. První sada vzorků byla zpracována v den odběru, tedy v den 0.

3.1.2 Chemikálie

- TRI reagent (Molecular Research Center, USA)
- Isopropanol (Sigma-Aldrich, USA)
- Chloroform (Sigma-Aldrich, USA)
- Ethanol 96% (VWR Chemicals, USA)
- DEPC Treated Water (Ambion, USA)
- Náhodné hexamery (Promega, USA)
- RNasin ribonuclease inhibitor (Promega, USA)
- RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, Litva)
- TaqMan sondy (Thermo Fisher Scientific, USA)
- LightCycler 480 Probes Master (Roche, Švýcarsko)
- 10 mM deoxyribonukleotid trifosfáty
 - 100 mM deoxycytidin trifosfát (Promega, USA)
 - 100 mM deoxyguanosin trifosfát (Promega, USA)
 - 100 mM deoxythymidin trifosfát (Promega, USA)
 - 100 mM deoxyadenosin trifosfát (Promega, USA)
 - Příprava: 4x 0,1 ml jednotlivých zásobních nukleotidů + doplněno DEPC treated vodou do 1 ml
- Lyzační roztok na erythrocyty 10x, množství na 1 litr RNA H₂O

- 82,9 g chloridu amonného (Lach-Ner, Česká republika)
- 7,9 g hydrogenuhličitanu amonného (Penta, Česká republika)
- 0,372 g kyseliny ethylendiamintetraoctové (Serva, Německo)
- K lyzaci je používán 1x koncentrovaný – 50 ml (10x konc.) + 450 ml RNA H₂O
- Fosfátový pufr (PBS) 10x, množství na 1 litr RNA H₂O
 - 80 g chloridu sodného (Mikrochem, Slovensko)
 - 2 g chloridu draselného (Lach-Ner, Česká republika)
 - 15,4 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného (Lach-Ner, Česká republika)
 - 2 g dihydrogenfosforečnanu draselného (VWR Chemicals, USA)
 - Pro izolaci buněk je používán 1x koncentrovaný – 50 ml (10x konc.) + 450 ml RNA H₂O
- Čistota všech použitých chemikálií je molecular grade.
- Všechny použité roztoky, špičky a zkumavky jsou RNase-free.

3.1.3 Přístrojové vybavení

- Laminární box Aura 2000 M.A.C. (BioAir, Itálie)
- Vortex Genie 2 (Scientific Industries, USA)
- Minicentrifuga MiniSpin plus (Eppendorf, Německo)
- Thermal Cycler PTC 100 (MJ Research, Inc., USA)
- Chlazená centrifuga Z323K (Hermle, Německo)
- Termoblok ThermoStat plus (Eppendorf, Německo)
- Váhy (Scaletec, Indie)
- Nanodrop ND 1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, USA)
- Minicentrifuga Smart 15 (Hanil Scientific Inc., Jižní Korea)
- Laminární box Scanlaf Mars Class II (LaboGene, Dánsko)
- Vortex VX-200 (Labnet International, Inc, USA)
- Minicentrifuga Combi Spin (Biosan, Lotyšsko)
- Centrifuga 5430 (Eppendorf, Německo)
- Real-time PCR termocyklér LightCycler 480 II (Roche, Švýcarsko)

3.1.4 Metody

3.1.4.1 Izolace leukocytů osmotickou lýzou erytrocytů

Zkumavka se vzorkem periferní krve byla centrifugována po dobu 3 min při 4 500 rpm a 4 °C. Po centrifugaci byla odebrána veškerá plazma, která byla zamrazena. K sedimentu krve byl přidán 1x koncentrovaný lyzační roztok v poměru 4:1 (zpravidla 40 ml lyzačního roztoku a 10 ml krve), který byl následně vrácen do lednice. Pokud se ve vzorku nacházely sraženiny, vzorek byl přelit do nové falkony. Vzorek byl za občasného protřepání ponechán na ledu po dobu 7-30 min, dokud nedošlo k vyčerení (vzniku lakové barvy). Poté byl vzorek 10 min centrifugován při 4 500 rpm a 4 °C. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a vzorek byl vypláchnut 5 ml lyzačního roztoku. Peleta byla rozklepána a ke vzorku bylo přidáno 20 ml 1x koncentrovaného lyzačního roztoku. Vzorek byl poté centrifugován 5 min při 4 500 rpm a 4 °C. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a peleta byla (pokud byla ještě červená) opatrně opláchnuta přibližně 5 ml fosfátového pufru (PBS). Peleta byla rozklepána a ke vzorku bylo přidáno 20 ml fosfátové pufru. Vzorek byl následně centrifugován 5 min při 4 500 rpm a 4 °C. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a buňky byly resuspendovány v 3-10 ml fosfátového pufru podle velikosti pelety. Vzorek byl pipetou několikrát promíchán a do zkumavek o objemu 1,5 ml bylo přeneseno 120 µl vzorku. Vzorky v mikrozkušavkách byly centrifugovány 4 min při 2 000 rpm a 4 °C. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a ke vzorkům byl opatrně přidáván vždy 1 ml TRI reagentu za současného promíchávání pipetou do rozpuštění. Vzorky buněčných TRI lyzátů byly promíchány na vortexu a následně zamrazeny (-18 až -30 °C).

3.1.4.2 Izolace RNA TRI reagentovou metodou

Vzorky buněčných TRI lyzátů byly rozmrazovány nejprve při 4 °C a poté při pokojové teplotě ve flowboxu, aby došlo ke kompletní disociaci nukleoproteinů. Ke vzorkům bylo přidáno 200 µl chloroformu a vzorky byly silně promíchány na vortexu (alespoň 30 sec). Vzorky byly poté ponechány 10 minut při pokojové teplotě. Během pauzy byl připraven 75% ethanol podle počtu vzorků (1 vzorek = 1,5 ml ethanolu + rezerva). Připravený ethanol byl vložen do lednice. Vzorky byly centrifugovány 15 min při 12 000 g a 4 °C. Po centrifugaci se ve vzorcích vytvořily 3 vrstvy: spodní růžová vrstva (detrit, lipidy, proteiny a DNA), prostřední mezivrstva (prstenec DNA) a vrchní vodná fáze (RNA). Přibližně 500 µl vrchní vodné fáze bylo vždy přeneseno do připravených mikrozkušavek o objemu

1,5 ml. K těmto vzorkům bylo následně přidáno stejné množství isopropanolu (400-500 μ l). Pro spojení obou vytvořených vrstev byly vzorky opakovaným protřepáním promíchány. Vzorky byly ponechány 5 minut při pokojové teplotě, probíhala precipitace RNA. Poté byly vzorky 10 min centrifugovány při 12 000 g a 4 °C. Po centrifugaci byl opatrně odstraněn supernatant a bílá (příp. průhledná) RNA peleta byla promyta 1,5 ml 75% ethanolu. Převrácením zkumavky byla opatrně odlepena peleta a vzorky byly centrifugovány 5 min při 12 000 g a 4 °C. Po centrifugaci byl odstraněn veškerý supernatant a RNA peleta byla ve flowboxu sušena na vzduchu do zprůhlednění (3-10 min). K usušené peletě bylo přidáno 25 μ l DEPC treated vody (21-60 μ l v závislosti na velikosti pelety). Obsah zkumavky byl několikrát promíchán pipetou a vzorky byly vloženy na 10 min do termobloku (60 °C), čímž se urychlí rozpuštění RNA. Následně byly vzorky ochlazeny v chladicím stojanu. Před uložením do mrazáku pro krátkodobé (-18 až -30 °C) nebo dlouhodobé uchování (-70 až -80 °C) byla stanovena koncentrace a čistota izolované RNA.

3.1.4.3 Stanovení koncentrace a čistoty RNA

Koncentrace a čistota izolované RNA byla měřena pomocí přístroje Nanodrop ND 1000. V počítači byl nejprve spuštěn program Nanodrop, ve kterém byl zvolen program pro měření RNA. Po vyzvání byl na čočku Nanodropu pipetou nanesen 1 μ l vody. Po zmáčknutí OK byla zahájena inicializace. V programu byl zvolen typ měření RNA-40. Jelikož jako blank byla používána voda, nebylo nutné ji znovu nanášet. Stisknutím ikony *blank* bylo provedeno vynulování přístroje. Po vynulování byla čtverečkem buničiny odsáta voda a čočka i rameno přístroje bylo očištěno. Na čočku byl opatrně nanesen 1 μ l vzorku a stisknutím ikony *Measure* bylo provedeno měření vzorku. Vzorek byl z čočky odsán a obě plochy byly opět očištěny. Po dokončení měření vzorků bylo provedeno měření vody. Poté byla voda opět odsáta a obě plochy byly opět očištěny buničinou.

3.1.4.4 Reverzní transkripce

Před začátkem práce byly 10 mM deoxyribonukleotid trifosfáty, 5x RT-pufr, hexamery a DEPC treated voda přemístěny z mrazáku do lednice. Po jejich rozpuštění byly krátce na poloviční výkon promíchány na vortexu a následně centrifugovány. RNAsin a reverzní transkriptáza byly přidávány po krátké centrifugaci přímo z mrazáku. Reverzní transkripce byla prováděna z 3 μ g izolované celkové RNA v reakčním objemu 30 μ l. Po vypočítání objemů jednotlivých složek byla do zkumavek o objemu 0,2 ml přidávána voda, RNA a náhodné hexamery v tomto pořadí. Po přidání vody byly zkumavky umístovány do chlazené

destičky. Následně bylo po promíchání pipetou přidáno množství vzorku odpovídající 3 μg RNA, poté 0,3 μg náhodných hexamerů a vzorek byl doplněn vodou do objemu 19,5 μl . Vzorky byly krátce na poloviční výkon promíchány na vortexu a následně centrifugovány. Po centrifugaci byly 5 minut inkubovány v termocykléru s vyhříváním víčkem při 70 $^{\circ}\text{C}$. Během inkubace byla připravena reakční směs (MasterMix). Do zkumavky o objemu 0,2 ml bylo přidáno 6 μl 5x RT-pufu, 3 μl 10 mM deoxyribonukleotid trifosfátů a 30 U RNAsinu. Obsah zkumavky byl krátce na poloviční výkon promíchán na vortexu a centrifugován. Po skončení inkubace byly vzorky rychle zchlazeny v chladicím stojánku, ve kterém byly ponechány asi 1 min. Ke zchlazeným vzorkům bylo přidáno 9,75 μl MasterMixu, směs byla promíchána pipetou a byla ponechána 5 min při laboratorní teplotě ve flowboxu. Čas byl měřen od přidání MasterMixu k prvnímu vzorku. Ke vzorkům bylo poté přidáno 150 U reverzní transkriptázy. Obsah zkumavek byl krátce na poloviční výkon promíchán na vortexu a centrifugován. Po centrifugaci byly vzorky ponechány 10 min při pokojové teplotě ve flowboxu. Zkumavky byly rovnoměrně naskládány do termocykléru s vyhříváním víčkem, kde byly 60 min inkubovány při 42 $^{\circ}\text{C}$, poté 10 min při 70 $^{\circ}\text{C}$ a na závěr došlo ke zchlazení programu termocykléru (4 $^{\circ}\text{C}$). Zkumavky byly krátce centrifugovány a poté uloženy do mrazáku pro krátkodobé (-18 až -30 $^{\circ}\text{C}$) nebo dlouhodobé uchování (-70 až -80 $^{\circ}\text{C}$).

3.1.4.5 Real-time PCR

Metoda PCR byla prováděna ze 100 ng cDNA v reakčním objemu 15 μl . Do zkumavky o objemu 2 ml byla připravena reakční směs (MasterMix) smícháním 5,5 μl vody z kitu LightCycler 480 Probes Master, 7,75 μl MasterMixu LightCycler 480 Probes Master 2x a 0,75 μl TaqMan sondy (Tab. 2). Uvedené množství odpovídá jednomu vzorku. Připravený MasterMix byl krátce promíchán na vortexu a centrifugován. Do vychlazené destičky byla připravena destička pro vzorky. Do jamek destičky bylo vždy přidáno 14 μl MasterMixu a 1 μl cDNA vzorků. Jako negativní kontrola byl namísto vzorku přidán 1 μl DEPC treated vody a jako pozitivní kontrola 1 μl specifických standardů. Destička s připravenými vzorky byla krátce centrifugována a poté byla vložena do real-time termocykléru. V počítači byl spuštěn příslušný program (Tab. 3). Po skončení byla provedena analýza PCR reakce.

Tab. 2: Použité TaqMan sondy pro amplifikaci genů GAPDH a ACTB

Název sondy	Assay ID	Katalogové číslo	Délka aplikonu (bp)
GAPDH	Hs02758991_g1	4331182	93
ACTB	Hs01060665_g1	4331182	63

Tab. 3: Průběh zvoleného programu pro amplifikaci genů GAPDH a ACTB

Průběh PCR cyklování	
Aktivace	95 °C/10 min
Touchdown 1	6 cyklů 95 °C/15s - 67 - 62 °C/20s
Touchdown 2	2 cykly 95 °C/15s - 60 - 58 °C/20s
Amplifikace	42 cyklů 95°C/15s - 56 °C/20s

3.2 Testování stability cirkulujících nádorových buněk

3.2.1 Biologický materiál

Pro testování stability CTCs byla využita buněčná linie U-87 MG poskytnutá Laboratoří buněčné biologie ÚMTM LF UP a periferní krev dobrovolníků z řad zaměstnanců Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého Olomouc (ÚMTM LF UP). Vzorky periferní krve byly odebrány do zkumavek Cell-Free DNA BCT (Streck), CellSave (Menarini-Silicon Biosystems), LBGard (Biomatrix), cf-DNA/cf-RNA (Norgen Biotek Corp.) a K₃EDTA (Vacuette, Greiner Bio-One). Odběr byl proveden do každého typu zkumavky 3x, čímž bylo dohromady získáno 15 vzorků.

3.2.2 Chemikálie

- LBD FACS Lysing Solution 10x (BD Biosciences, USA)
- Anti-GFAP (GA5) myší monoklonální protilátky, konjugované s Alexa Fluor 488 (Cell Signaling Technology, USA)
- 4,6-diamidin-2-fenylindol (Carl Roth GmbH, Německo)
- Anti-CD45 myší monoklonální protilátky (HI30), konjugované s allofukocyaninem eBioscience (Invitrogen, USA)
- Hovězí sérový albumin, čistota 98% (VWR International, USA)
- Mounting Medium (DuoLink, Velká Británie)
- Fixogum (Marabu, Německo)
- Fosfátový pufr (PBS) 1x

3.2.3 Přístrojové vybavení

- Minitřepačka výkyvná 3D (VWR International, USA)
- Chlazená centrifuga Z323K (Hermle, Německo)
- Centrifuga 5430 (Eppendorf, Německo)
- Cytotrack CT11 (CytoTrack ApS, Dánsko)
- CytoDisc (CytoTrack ApS, Dánsko)
- CytoCover (CytoTrack ApS, Dánsko)

3.2.4 Metody

3.2.4.1 Příprava vzorků

Suspenze buněk buněčné linie U-87 MG o koncentraci 256 000 buněk/ml byla pomocí vody naředěna na koncentraci 1000 buněk/ml. Buněčná suspenze byla vždy před ředěním a přenášením promíchána na vortexu a krátce centrifugována. Do 15 zkumavek se vzorky periferní krve (3x Cell-Free DNA BCT, 3x CellSave, 3x LBGard, 3x cf-DNA/cf-RNA a 3x K₃EDTA) bylo po důkladném promíchání pipetou odebráno 100 µl z buněčné suspenze o koncentraci 1 000 buněk/ml. Do každé zkumavky bylo tedy přidáno 100 buněk. Po přidání buněčné suspenze byl obsah zkumavky opatrně promíchán otáčením zkumavky o 360 °. Vzorky byly následně uchovány při laboratorní teplotě po dobu 24, 72 a 168 hodin.

3.2.4.2 Zpracování krevního vzorku

Vzorek byl po opatrném promíchání plazmy z původní zkumavky přelit do plastové falkony o objemu 15 ml. Falkona byla poté centrifugována po dobu 15 min při 2500 g. Po centrifugaci byla odebrána plazma, přibližně 0,5 ml plazmy bylo ponecháno ve zkumavce. Následně byl ze vzorku krouživým pohybem pipety izolován 1-2 ml tzv. Buffy coatu, který byl přenesen do nové falkony o objemu 15 ml. Buffy coat je vrstva, která obsahuje trombocyty a leukocyty a ve vzorku se nachází nad erytrocyty. Falkona byla doplněna do 10 ml lyzačním roztokem BD FACS 1x. Vzorek byl 15 min inkubován při pokojové teplotě na výkyvné minitřepačce, probíhala lýza erytrocytů. Poté byl vzorek centrifugován po dobu 15 min při 2500 g. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant. Do mikrozkušavky o objemu 2 ml byla připravena směs protilátek pro barvení nádorových buněk. Pro jeden vzorek bylo smícháno 8 µl anti-GFAP, 3 µl DAPI, 5 µl anti-CD45 a 41 µl 1% roztoku hovězího sérového albuminu (BSA). Takto připravená směs protilátek byla promíchána na vortexu a 60 µl směsi bylo přeneseno do falkony se vzorkem. Vzorek byl poté 60 min inkubován v chladu a ve tmě v lednici. Po skončení inkubace bylo ke vzorku přidáno 10 ml fosfátového pufru s 1% roztokem hovězího sérového albuminu. Vzorek byl opatrně promíchán a byl inkubován 5 min v lednici. Následně byl odstraněn supernatant a ke vzorku byly přidány nejprve 3 ml fosfátového pufru s 0,5% roztokem hovězího sérového albuminu, ve kterém byl vzorek pečlivě pipetou promíchán, a poté byla falkona doplněna roztokem do 10 ml. Vzorek byl centrifugován při 2500 g 15 min. Po odstranění supernatantu byl ke vzorku přidán 1 ml Milli-Q vody a vzorek byl promíchán.

3.2.4.3 Aplikace vzorku na CytoDisc

Celý objem vzorku, získaného předešlým postupem, byl pipetou nanesen na CytoDisc. Špičkou na pipetě byl vzorek krouživými pohyby pečlivě a rovnoměrně roztírán po povrchu disku. Přibližně 0,5 cm od kraje byl ponechán prázdný pruh. Disk se vzorkem byl sušen v laminárním boxu ve tmě do druhého dne. Po usušení bylo do jednoho místa ve středu disku aplikováno 360 μ l Mounting Media a disk s médiem byl opatrně překryt krycím sklem CytoCover, přičemž se médium rovnoměrně rozprostřelo po celé ploše disku. Případně vzniklé vzduchové bubliny byly opatrně vytlačeny a okraje mezi krycím sklem a diskem byly zalepeny pomocí elastického lepidla Fixogum. Po zalepení byl disk sušen v laminárním boxu při pokojové teplotě alespoň 30 min.

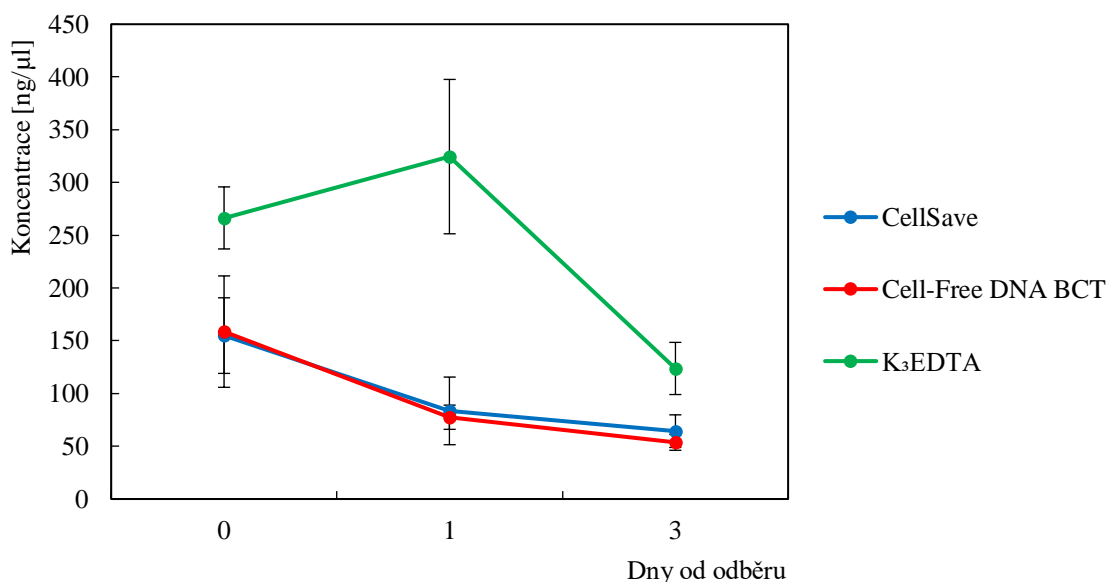
3.2.4.4 Skenování vzorku

Disk se vzorkem byl před skenováním očištěn 80% ethanolem a vyleštěn ubrousky na optiku. Poté byl vložen do skenovacího prostoru uvnitř přístroje CytoTrack, ve kterém byl nastaven objektiv 20x/0,75. Nejprve byl v příslušném softwaru zvolen filtr pro DAPI, pomocí kterého bylo na zobrazených buněčných jádrech zaostřeno několik výchozích bodů. Následně byl uvnitř přístroje vyměněn objektiv za objektiv 20x/0,50 a bylo spuštěno skenování celého disku. Před skenováním bylo možné podle potřeby upravit některé parametry, nejčastěji výstupní výkon laseru. Po naskenování disku byla přístrojem vybrána místa (tzv. hotspoty), ve kterých byl detekován fluorescenční signál, nejčastěji několik stovek míst. Opět byl vyměněn objektiv zpět na objektiv 20x/0,75 a hotspoty byly za použití příslušných filtrů optického systému vyhodnocovány, zda na nich byla nebo nebyla přítomna nádorová buňka.

3.3 Výsledky

3.3.1 Testování stability RNA

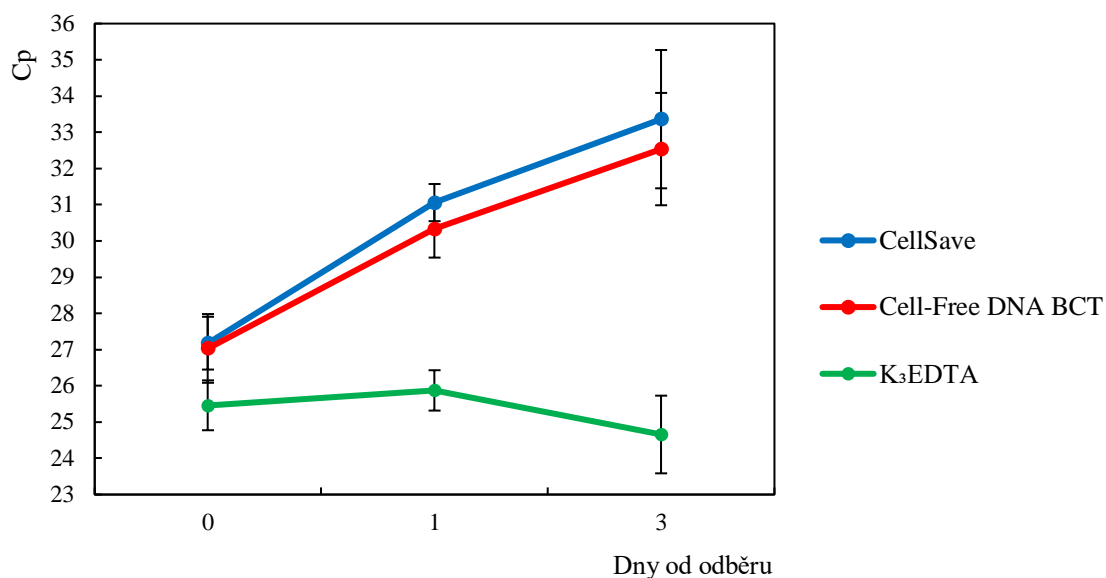
V této části experimentu byly vzorky periferní krve odebírány do různých odběrových zkumavek, ve kterých byly uchovávány po stanovenou dobu. První sada vzorků byla zpracována v den odběru, druhá po 24 hodinách a třetí po 72 hodinách. Koncentrace a čistota izolované RNA byla analyzována spektrofotometricky pomocí Nanodropu ND 1000. Na Obr. 3 jsou graficky znázorněny změny koncentrací RNA v závislosti na době uskladnění vzorků a zvoleném typu zkumavky. Nejvyšší koncentrace RNA se nacházely v K₃EDTA zkumavce. V testovaných alternativách (CellSave a Cell-Free DNA BCT) byly pak koncentrace RNA výrazně nižší, ale jejich hodnoty byly velice podobné. Hlavním rozdílem mezi K₃EDTA zkumavkou a testovanými alternativami je způsob stabilizace vzorků. Testované alternativy způsobují okamžitou lýzu buněk, zatímco K₃EDTA zkumavky zabraňují koagulaci neporušených buněk. U vzorků v K₃EDTA zkumavce pozorujeme po 24 hodinách nárůst koncentrace a poté prudký pokles, zatímco v testovaných alternativách koncentrace pouze klesala. Nárůst koncentrace může být způsoben skutečností, že buňky byly vystaveny buněčnému stresu, který je spojen se zvýšenou syntézou mRNA a proteinů, a následné lýze buněk 72 hodin od odběru.



Obr. 3: Závislost koncentrace RNA na době uchování krevních vzorků a zvoleném typu zkumavky (CellSave, Cell-Free DNA BCT a K₃EDTA).

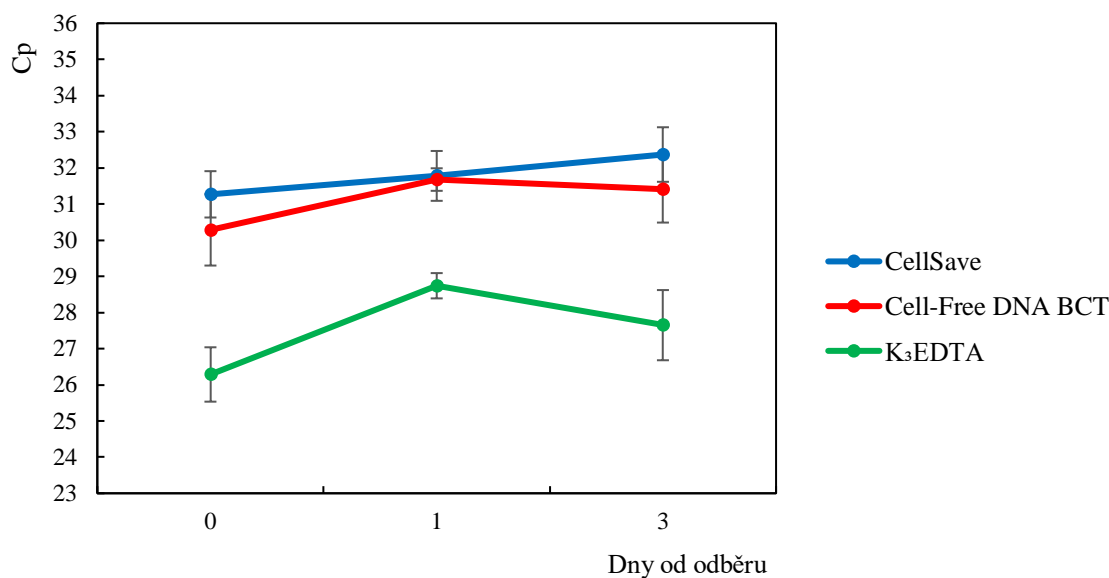
Čistota RNA izolované ze vzorků v den odběru byla vyhovující, poměr absorbancí při 260/280 nm se pohyboval u všech typů zkumavek v rozmezí 1,68-1,9. V K₃EDTA zkumavkách zůstávala čistota RNA velice dobrá i po delších časových intervalech (po 72 hodinách v rozmezí 1,63-1,74). Naproti tomu ve zkumavkách CellSave klesla čistota RNA už po 24 hodinách k hodnotám 1,43-1,53, což bylo pravděpodobně způsobeno přítomností různých konzervačních činidel a nepřítomností RNA stabilizátorů, ovlivňující absorbanci a výslednou koncentraci RNA. Čistota vzorků ve zkumavkách Cell-Free DNA BCT se po 72 hodinách pohybovala v rozmezí 1,39-1,48.

Schopnost jednotlivých zkumavek stabilizovat hladinu exprese mRNA ve vzorku periferní krve po určitou dobu od odběru byla analyzována prostřednictvím real-time PCR, kdy byla sledována exprese dvou tzv. housekeeping genů: glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa (GAPDH) a β -aktin (ACTB). Housekeeping geny jsou v molekulární biologii využívány jako referenční, jelikož jejich produkty zajišťují životně důležité funkce ve všech buňkách a jejich exprese je tak za určitých okolností relativně stabilní. Na Obr. 4 jsou graficky znázorněny změny RNA exprese genu GAPDH v závislosti na typu zkumavky a době uchování vzorku. Hodnota C_p udává, ve kterém cyklu PCR reakce došlo k detekci fluorescence vzorku nad úroveň pozadí, a je tak používána pro určení koncentrace původní templátové cDNA. Čím je tedy hodnota C_p nižší, tím více dané mRNA se ve vzorku nacházelo. Nejvyšší hladiny mRNA se nacházely v K₃EDTA zkumavkách a v průběhu skladování vzorků u nich docházelo jen k minimálním změnám. V testovaných alternativách byly v den odběru hladiny mRNA téměř totožné a v obou případech došlo k jejich značnému snížení. Po 24 hodinách se počet cyklů potřebných k detekci signálu posunul o 3, resp. 4, což značí snížení koncentrace mRNA přibližně o 1 desetinný řád. Po 72 hodinách došlo v porovnání s prvními vzorky k posunutí C_p hodnoty o 5, resp. 6 cyklů. U zkumavky CellSave a Cell-Free DNA BCT tedy došlo ke snížení exprese GAPDH o 2 desetinné řády po 72 hodinách od odběru.



Obr. 4: Změny exprese genu GAPDH v závislosti na době uchování vzorku a zvoleném typu zkumavky (CellSave, Cell-Free DNA BCT a K₃EDTA).

Na Obr. 5 jsou graficky znázorněny změny RNA exprese genu ACTB v závislosti na zvoleném typu zkumavky a době uchování vzorku. V den odběru byla nejvyšší míra exprese ACTB opět v K₃EDTA zkumavce. Ve všech zkumavkách došlo během 72 hodin k mírnému poklesu exprese ACTB.

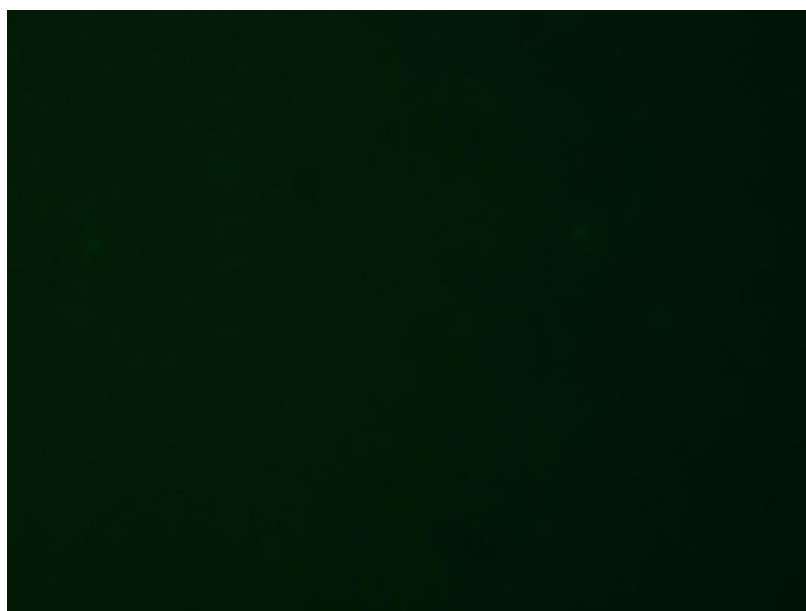


Obr. 5: Změny exprese genu ACTB v závislosti na době uchování vzorku a zvoleném typu zkumavky (CellSave, Cell-Free DNA BCT a K₃EDTA).

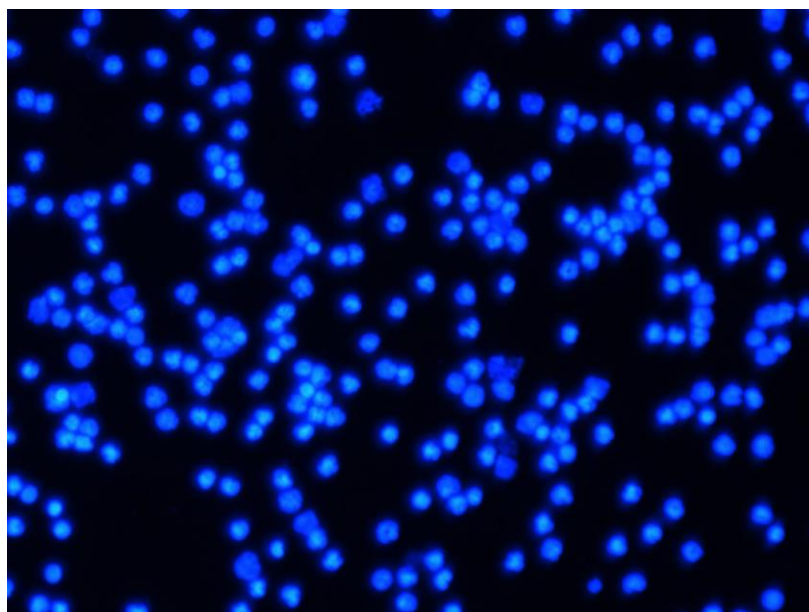
3.3.2 Testování stability cirkulujících nádorových buněk

V této části experimentu byly vzorky periferní krve odebrány do 5 různých typů odběrových zkumavek. Ke vzorkům krve v pěti typech transportních zkumavek bylo přidáno 100 buněk buněčné linie lidského glioblastomu U-87 MG. Tyto vzorky byly skladovány při pokojové teplotě 24, 72 a 168 hodin. Přítomnost nádorových buněk byla analyzována imunofluorescenční metodou pomocí přístroje CytoTrack. Pro detekci nádorových buněk byly zvoleny pozitivní markery GFAP a DAPI a negativní marker CD45.

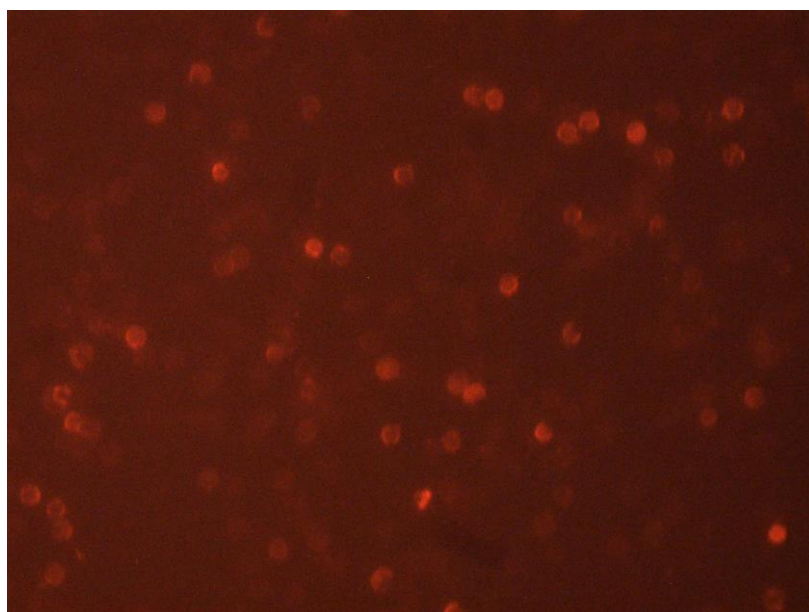
Při skenování první sady vzorků, které byly uskladněny 24 hodin, nebyla v žádné z použitých zkumavek prokázána přítomnost nádorových buněk buněčné linie U-87 MG, protože nebyl detekován signál při značení anti-GFAP protilátkami (Obr. 6). Na snímcích pozorujeme četné leukocyty (anti-CD45 pozitivní buňky) (Obr. 8) U zkumavky CellSave byla za použití filtru pro DAPI pozorována jádra buněk, pravděpodobně leukocytů, která měla kulatý, ale i nefyziologický měsíčkovitý tvar. Také byly na mnoha místech pozorovány útvary typické pro usmrcené buňky v důsledku narušení buněčné membrány, což mohlo být způsobeno vytlačováním bublin vzniklých při aplikaci krycího skla. U zkumavky cf-DNA/cf-RNA naopak nebyly nalezeny buňky skoro žádné, což představovalo problém hlavně při zaměřování výchozích bodů před skenováním.



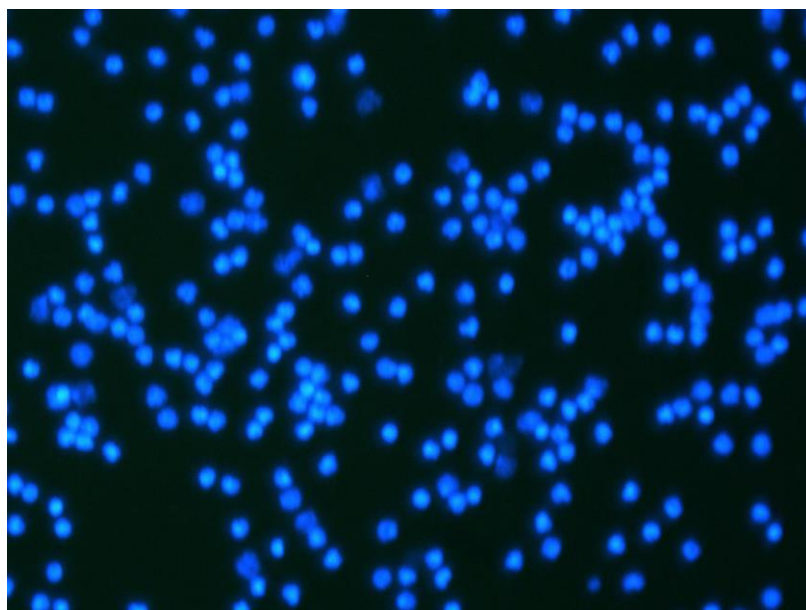
Obr. 6: Reprezentativní snímek z přístroje CytoTrack, na němž není detekován žádný fluorescenční signál, který by značil přítomnost nádorových buněk buněčné linie U-87 MG. Pro značení byly využity anti-GFAP myší monoklonální protilátky konjugované s Alexa Fluor 488, zvětšení 20x.



Obr. 7: Reprezentativní snímek z přístroje CytoTrack zobrazující jádra buněk obarvená fluorescenčním barvivem DAPI, zvětšení 20x.



Obr. 8: Reprezentativní snímek z přístroje CytoTrack zobrazující četné leukocyty značené anti-CD45 myšími monoklonálními protilátkami konjugovanými s allofykocyaninem, zvětšení 20x.



Obr. 9: Reprezentativní snímek z přístroje CytoTrack zobrazující proložení fluorescenčních signálů protilátek anti-GFAP a fluorescenčního barviva DAPI. Na snímku jsou viditelná jádra buněk, ale nejsou viditelné žádné nádorové buňky buněčné linie U-87 MG, zvětšení 20x.

3.4 Diskuze

Výše uvedené výsledky popisují změny hladin mRNA dvou vybraných genů ve vzorcích periferní krve po dobu 3 dnů od odběru. Jak bylo zmíněno v teoretické části, pro správnou a přesnou analýzu je klíčové, aby během transportu vzorků do laboratoře nedocházelo ke změnám, které by zásadně ovlivnily výsledky nadcházejících testů.

V experimentální části byla pro testování stability RNA použita zkumavka Cell-Free DNA BCT, která je určena pro stabilizaci DNA. Z publikovaných studií byla pouze ve dvou případech použita tato zkumavka pro testování stability RNA. Sorber *et al.* (2019) mimo jiné porovnávali také schopnost stabilizovat cfRNA ve zkumavkách K₂EDTA a Cell-Free DNA BCT. Vzorky v K₂EDTA zkumavkách byly zpracovány do 2 hodin od odběru a vzorky v Cell-Free DNA BCT zkumavkách byly uchovány při laboratorní teplotě 24 hodin. Ukázalo se, že cfRNA izolovaná z plazmy a trombocytů se v K₂EDTA zkumavkách nacházela ve vysoké koncentraci. Ve zkumavkách Cell-Free DNA BCT se naproti tomu cfRNA nenacházela vůbec nebo ve velmi nízkých koncentracích. Podmínky stabilizace cfDNA byly naopak srovnatelné u obou zkumavek.

Společnost Streck Corporate na začátku roku 2020 představila novou zkumavku RNA Complete BCT pro stabilizaci cfRNA a EV. Při této příležitosti zveřejnila článek popisující její výhody včetně porovnání vlastních EDTA zkumavek a Cell-Free DNA BCT. Vzorky krve byly skladovány při pokojové teplotě po dobu 7 dnů. Obě testované zkumavky nebyly schopny stabilizovat hladiny cfRNA v porovnání s hodnotami hladin v den odběru. Ve zkumavce Cell-Free DNA BCT byl také zaznamenán značný nárůst EV. Společnost Streck Corporate i Sorber *et al.* (2019) se tedy nezávisle na sobě shodují v názoru, že použití zkumavek Cell-Free DNA BCT není pro stabilizaci cfRNA příliš vhodné (<https://www.streck.com/blog/new-tube-maintains-evs-and-cfrna/>).

V tomto experimentu se pro stabilizaci hladiny mRNA genu GAPDH jeví jako nejlepší varianta běžná K₃EDTA zkumavka. Tento výsledek je v rozporu s většinou již prováděných experimentů. V dále uváděných experimentech je používána zkumavka Cell-Free RNA BCT, která se od námi používané Cell-Free DNA BCT liší (popsáno výše). Das *et al.* (2014) sledovali expresi genu GAPDH po dobu 3 dnů od odběru a k porovnání použili zkumavku K₃EDTA a Cell-Free RNA BCT. V K₃EDTA zkumavce se u nich po 24 hodinách počet kopií mRNA GAPDH 5,8-krát zvýšil v porovnání s počtem kopií v den odběru, toto zvýšení bylo statisticky významné ($p = 0,01$). Tsui *et al.* (2002) sledovali hladinu mRNA

GAPDH v plazmě po dobu 24 hodin. Vzorky byly uschovány v EDTA zkumavkách při laboratorní teplotě. Již po 6 hodinách od odběru pozorovali v plazmě významné zvýšení koncentrace mRNA GAPDH. Fernando *et al.* (2012) sledovali expresi GAPDH po dobu 3 dnů za použití K₃EDTA a Cell-Free RNA BCT zkumavek. Po 3 dnech pozorovali v K₃EDTA zkumavce v plazmě až 22-násobné zvýšení hladin mRNA GAPDH, došlo tedy ke zvýšení hladin o 1 desetinný řád. Salway *et al.* (2008) sledovali expresi GAPDH v EDTA zkumavkách. Po 36 hodinách zaznamenali v buffy coatu 11-násobný nárůst molekul mRNA GAPDH, tedy nárůst o 1 desetinný řád.

Fernando *et al.* (2012) a Salway *et al.* (2008) sdílí stejný názor, že zvýšení hladin mRNA GAPDH je způsobeno tím, že leukocyty v K₃EDTA zkumavce už po 24 hodinách od odběru podléhají apoptóze či nekróze. V důsledku nekrózy dochází k uvolnění jejich buněčného obsahu do plazmy a při apoptóze je buněčný obsah rozdělen do apoptotických tělísek, která jsou následně narušena během extrakčního procesu. Velké množství takto uvolněné cfRNA potom může při analýze znemožňovat detekci hledané varianty cfRNA, která se v plazmě nachází jen ve velmi malém množství.

Pro stabilizaci exprese genu ACTB poskytly v tomto experimentu dobré podmínky všechny testované zkumavky. Ve všech zkumavkách došlo pouze k mírnému poklesu exprese ACTB. Přihlédneme-li k hodnotám koncentrace mRNA ACTB, tak se zdá být jako nejlepší varianta také K₃EDTA zkumavka. Dosud žádná publikovaná studie nevyžívala pro stabilizaci mRNA ACTB zkumavky určené pro stabilizaci DNA. Tento experiment je tedy první, který poměrně úspěšně otestoval stabilitu mRNA ACTB ve zkumavkách Cell-Free DNA BCT.

Qin *et al.* (2013) analyzovali změny hladin cell-free mRNA genu ACTB v plazmě po dobu 3 dnů za použití zkumavek K₃EDTA a Cell-Free RNA BCT. Jedna sada vzorků byla doručovací společností převážena v boxu při okolní teplotě a jedna sada byla uchována v laboratoři při 22 °C. Převážené vzorky byly během transportu vystaveny teplotám v rozmezí 14,9 – 28,5 °C. U vzorků v K₃EDTA zkumavce, které byly převáženy, došlo v plazmě k 107-násobnému zvýšení koncentrace cell-free mRNA ACTB a u vzorků, které převáženy nebyly, k 35-násobnému zvýšení. Značné zvýšení koncentrace cell-free mRNA ACTB při prevozu bylo pravděpodobně způsobeno otřesy, které narušují integritu buněk, čímž způsobují uvolnění buněčného obsahu do plazmy. Zkumavky Cell-Free RNA BCT tomuto narušení buněk předcházejí, došlo u nich tedy za stejných podmínek jen k nepatrnému zvýšení koncentrace. Holford *et al.* (2008) sledovali změny hladin cell-free mRNA ACTB v plazmě za použití EDTA zkumavek. Vzorky byly uchovány na ledu při

4 °C. Během 2 a 5 hodin pozorovali podstatné snížení koncentrace cell-free mRNA ACTB až o 1 desetinný řád.

Porovnáme-li stabilitu exprese obou studovaných genů po celou dobu experimentu, tak exprese genu ACTB byla ve všech typech zkumavek mnohem stabilnější než exprese genu GAPDH. Oba geny jsou jedny z nejpoužívanějších srovnávacích genů.

Druhá část experimentu byla zaměřena na testování stability nádorových buněk, protože přítomnost CTCs v krevní cirkulaci je velice vzácná a představuje zásadní informaci. Bohužel po analýze první sady vzorků nebyly detekovány žádné nádorové buňky. Vzhledem k poměrně velkému množství aplikovaných buněk je velice nepravděpodobná ztráta všech nádorových buněk v průběhu standardního zpracování vzorků. Ve všech analyzovaných vzorcích byly přítomny leukocyty. Během zpracování vzorků mohlo tedy dojít k technické chybě, např. přeskočení některého z kroků. Jedna z dalších možných příčin neúspěchu je skutečnost, že u použité šarže buněčné linie nedocházelo k expresi GFAP, proto nemohly být buňky pomocí použitých protilátek detekovány. Ověření exprese GFAP u použité šarže buněčné linie a zopakování experimentu by vyžadovalo důkladnější přípravu, a proto z důvodů časové náročnosti není zahrnuto do této práce.

Podle informací uváděných výrobcí by nejlepší podmínky stabilizace CTCs měly poskytovat zkumavky cf-DNA/cf-RNA (Norgen) a Cell-Free DNA BCT (Streck). Qin *et al.*, (2014) porovnávali stabilizační schopnosti zkumavek K₃EDTA, CellSave a Cell-Free DNA BCT. Po 4 dnech skladování při laboratorní teplotě byly nádorové buňky nejlépe stabilizovány ve zkumavkách Cell-Free DNA BCT (míra návratnosti 58 %) a CellSave (míra návratnosti 54 %). Ve zkumavkách K₃EDTA byla po 4 dnech míra návratnosti pouhých 16 %, což je naprosto nevyhovující výsledek.

Ilie *et al.* (2018) porovnávali mimo jiné také morfologii CTCs a leukocytů ve zkumavkách K₃EDTA a Cell-Free DNA BCT u pacientů s plicními karcinomy. Z obou typů zkumavek byly po 2 a 24 hodinách izolovány leukocyty a CTCs. V K₃EDTA zkumavkách byly po 24 hodinách pozorovány výrazné změny morfologie, zatímco buňky v Cell-Free DNA BCT zkumavkách zůstávaly neporušené.

Luk *et al.* (2017) srovnávali stabilizační schopnosti zkumavek K₃EDTA, ACD-B (zkumavka s roztokem citrátu a dextrózy, Vacuette), Cell-Free DNA BCT, Cell-Free RNA BCT a Cyto-Chex BCT. Analýza byla prováděna v den přidání nádorových buněk ke vzorkům krve a poté 24, 30 a 48 hodin od přidání. Všechny testované zkumavky prokázaly

velice podobné schopnosti stabilizace, proto jsou podle autorů běžné zkumavky s obsahem EDTA a citrátu vhodné pro stabilizaci nádorových buněk po 48 hodin od odběru.

Riethdorf *et al.* (2007) testovali schopnosti stabilizace CTCs ve zkumavkách CellSave. Vzorky periferní krve pacientů s metastazujícími nádory prsu byly uchovány při 4 °C a pokojové teplotě po dobu 24, 48 a 72 hodin. Porovnáním se vzorky v den odběru byly CTCs stabilní i po 72 hodinách při obou testovaných teplotách. Míra návratnosti se pohybovala v rozmezí 80 - 82 %. U vzorků, které byly skladovány při 4 °C, byly zaznamenány větší změny v počtu detekovaných CTCs než u vzorků, které byly skladovány při pokojové teplotě.

3.5 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo provést hodnocení stability RNA a CTCs v různých typech transportních zkumavek po stanovenou dobu a identifikovat nejvhodnější stabilizační systém, který by byl schopen stabilizovat současně RNA i CTCs. V teoretické části byla vypracována rešerše shrnující informace o cirkulujících nádorových buňkách a RNA, včetně jejich výskytu v lidském těle a metod izolace a analýzy.

Schopnost stabilizace RNA byla testována po dobu tří dnů ve třech různých typech transportních zkumavek. Koncentrace a čistota izolované RNA byly ověřovány spektrofotometricky. Hladiny mRNA dvou vybraných genů byly analyzovány pomocí real-time PCR. V rámci experimentální části byla testována schopnost stabilizace RNA ve zkumavce, která je určena pro stabilizaci DNA. Ukázalo se, že zkumavky určené pro stabilizaci DNA nejsou pro stabilizaci RNA vhodné. Naopak po dobu 24 - 48 hodin je pro stabilizaci RNA dostačující běžná K₃EDTA zkumavka.

Schopnost stabilizace CTCs měla být testována po dobu dvou týdnů v pěti různých typech transportních zkumavek. Vzorky periferní krve se známým přidaným množstvím nádorových buněk buněčné linie lidského glioblastomu byly testovány imunofluorescenční metodou pomocí přístroje CytoTrack. Při skenování první sady vzorků po 24 hodinách nebyla prokázána přítomnost žádné nádorové buňky ani v jednom z testovaných vzorků. Experiment z tohoto důvodu nebylo možné vyhodnotit. V teoretické části byl vypracován přehled vhodných zkumavek pro stabilizaci CTCs. Na základě literární rešerše by nejvhodnější zkumavkou pro stabilizaci CTCs měla být zkumavka cf-DNA/cf-RNA (Norgen). Na základě výsledků publikovaných studií by nejlepší podmínky stabilizace CTCs měla poskytovat zkumavka Cell-Free DNA BCT (Streck). Dostačující podmínky stabilizace CTCs po dobu 24 - 48 hodin poskytuje také běžná K₃EDTA zkumavka.

3.6 Použitá literatura

- AdnaTest ProstateCancer: <https://www.qiagen.com/au/products/discovery-and-translational-research/exosomes-ctcs/circulating-tumor-cells/adnatest-prostate-cancer/#orderinginformation> (18. 7. 2020)
- Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2014). Challenges in circulating tumour cell research. *Nature Reviews Cancer*, *14*(9), 623–631. <https://doi.org/10.1038/nrc3820>
- Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2016). Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discovery*, *6*(5), 479–491. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1483>
- Allard, W. J., Matera, J., Miller, M. C., Repollet, M., Connelly, M. C., Rao, C., Tibbe, A. G. J., Uhr, J. W., & Terstappen, L. W. M. M. (2004). Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clinical Cancer Research*, *10*(20), 6897–6904. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0378>
- Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., Mitchell, P. S., Bennett, C. F., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Stirewalt, D. L., Tait, J. F., & Tewari, M. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(12), 5003–5008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019055108>
- Augello F. A.; Bastian H.; Oelmüller U.; Rainen L.; Walenciak M.; Wyrich R. (2003) Method and device for collecting and stabilizing a biological sample. US 6602718B1.
- Banfi, G., Salvagno, G. L., & Lippi, G. (2007). The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clinical Chemical Laboratory Medicine*, *45*(5), 565–576. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2007.110>
- Bock, C., Rack, B., Huober, J., Andergassen, U., Jeschke, U., & Doisneau-Sixou, S. (2014). Distinct expression of cytokeratin, N-cadherin and CD133 in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Future Oncology*, *10*(10), 1751–1765. <https://doi.org/10.2217/fon.14.58>
- Burger, D., Schock, S., Thompson, C. S., Montezano, A. C., Hakim, A. M., & Touyz, R. M. (2013). Microparticles: biomarkers and beyond. *Clinical Science*, *124*(7), 423–441. <https://doi.org/10.1042/CS20120309>
- Cai, X., Hagedorn, C. H., & Cullen, B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna*, *10*(12), 1957–1966. <https://doi.org/10.1261/rna.7135204>
- Carthew, R. W. (2006). Gene regulation by microRNAs. *Current Opinion in Genetics & Development*, *16*(2), 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2006.02.012>
- Cavallo, F., De Giovanni, C., Nanni, P., Forni, G., & Lollini, P.-L. (2011). 2011: the immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *60*(3), 319–326. <https://doi.org/10.1007/s00262-010-0968-0>
- Cayrefourcq, L., & Alix-Panabières, C. (2019). CTCs as Liquid Biopsy: Where Are We Now? *Molecular Medicine*, IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84366>

- Cell-Free DNA BCT®: <https://www.streck.com/products/stabilization/cell-free-dna-bct/> (18. 7. 2020)
- CellSave Preservative Tubes: <https://www.cellsearchctc.com/product-systems-overview/cellsave-preservative-tubes?&tab=1> (7. 7. 2020)
- cf-DNA/cf-RNA Preservative Tubes: <https://norgenbiotek.com/product/cf-dnacf-rna-preservative-tubes> (18. 7. 2020)
- Chambers, A. F., Groom, A. C., & MacDonald, I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer*, 2(8), 563–572. <https://doi.org/10.1038/nrc865>
- Chambers, A. F., Naumov, G. N., Varghese, H. J., Nadkarni, K. V., MacDonald, I. C., & Groom, A. C. (2001). Critical Steps in Hematogenous Metastasis. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 10(2), 243–255. [https://doi.org/10.1016/S1055-3207\(18\)30063-2](https://doi.org/10.1016/S1055-3207(18)30063-2)
- Chen, C. L., Mahalingam, D., Osmulski, P., Jadhav, R. R., Wang, C. M., Leach, R. J., Chang, T. C., Weitman, S. D., Kumar, A. P., Sun, L., Gaczynska, M. E., Thompson, I. M., & Huang, T. H. M. (2013). Single-cell analysis of circulating tumor cells identifies cumulative expression patterns of EMT-related genes in metastatic prostate cancer. *Prostate*, 73(8), 813–826. <https://doi.org/10.1002/pros.22625>
- Chen, J.-F., Ho, H., Lichterman, J., Lu, Y.-T., Zhang, Y., Garcia, M. A., Chen, S.-F., Liang, A.-J., Hodara, E., Zhau, H. E., Hou, S., Ahmed, R. S., Luthringer, D. J., Huang, J., Li, K.-C., Chung, L. W. K., Ke, Z., Tseng, H.-R., & Posadas, E. M. (2015). Subclassification of prostate cancer circulating tumor cells by nuclear size reveals very small nuclear circulating tumor cells in patients with visceral metastases. *Cancer*, 121(18), 3240–3251. <https://doi.org/10.1002/cncr.29455>
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*, 15(3), 532–534, 536–537. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7692896>
- Cross, S. E., Jin, Y.-S., Rao, J., & Gimzewski, J. K. (2007). Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nature Nanotechnology*, 2(12), 780–783. <https://doi.org/10.1038/nano.2007.388>
- Cytotrack Technology: <http://www.cytotrack.com/index.php/technology> (18. 7. 2020)
- Das, K., Norton, S. E., Alt, J. R., Krzyzanowski, G. D., Williams, T. L., & Fernando, M. R. (2014). Stabilization of Cellular RNA in Blood During Storage at Room Temperature: A Comparison of Cell-Free RNA BCT® with K3EDTA Tubes. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 18(6), 647–653. <https://doi.org/10.1007/s40291-014-0118-z>
- Etheridge, A., Gomes, C. P. C., Pereira, R. W., Galas, D., & Wang, K. (2013). The complexity, function and applications of RNA in circulation. *Frontiers in Genetics*, 4(JUN), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00115>
- Farrell, R. E. (2017). RNA Isolation Strategies. In *RNA Methodologies* (Vol. 40, pp. 75–115). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804678-4.00003-8>
- Feddersen, S., Bastholt, L., & Pedersen, S. M. (2016). Stabilization of circulating thyroglobulin mRNA transcripts in patients treated for differentiated thyroid carcinoma. *Annals of Clinical Biochemistry*, 54(5), 000456321667153. <https://doi.org/10.1177/0004563216671538>

- Fernando M. R. (2013) Preservation of cell-free RNA in blood samples. US 8586306B2.
- Fernando, M. R., Norton, S. E., Luna, K. K., Lechner, J. M., & Qin, J. (2012). Stabilization of cell-free RNA in blood samples using a new collection device. *Clinical Biochemistry*, 45(16–17), 1497–1502. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.07.090>
- Fidler, I. J. (1970). Metastasis: Quantitative Analysis of Distribution and Fate of Tumor Emboli Labeled With ¹²⁵I-5-Iodo-2'-deoxyuridine. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 45(4), 773–782. <https://doi.org/10.1093/jnci/45.4.773>
- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 453–458. <https://doi.org/10.1038/nrc1098>
- Fidler, I. J. (2005). Cancer biology is the foundation for therapy. *Cancer Biology & Therapy*, 4(9), 1036–1039. <https://doi.org/10.4161/cbt.4.9.2111>
- Gershon, D. (2002). An array of opportunities. *Nature*, 416(6883), 887–889. <https://doi.org/10.1038/416885a>
- Gires, O., Klein, C. A., & Baeuerle, P. A. (2009). On the abundance of EpCAM on cancer stem cells. *Nature Reviews Cancer*, 9(2), 143–143. <https://doi.org/10.1038/nrc2499-c1>
- Gires, O., & Stoecklein, N. H. (2014). Dynamic EpCAM expression on circulating and disseminating tumor cells: causes and consequences. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(22), 4393–4402. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1693-1>
- Gupta, G. P., & Massagué, J. (2006). Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell*, 127(4), 679–695. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.001>
- Gupta, V., Jafferji, I., Garza, M., Melnikova, V. O., Hasegawa, D. K., Pethig, R., & Davis, D. W. (2012). ApoStream™, a new dielectrophoretic device for antibody independent isolation and recovery of viable cancer cells from blood. *Biomicrofluidics*, 6(2), 024133. <https://doi.org/10.1063/1.4731647>
- Haj-Ahmad T. A.; Haj-Ahmad Y. (2019) Preservation of cell-free nucleic acids in biological samples. CN 109153992A.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hernandez, N. (2001). Small Nuclear RNA Genes: a Model System to Study Fundamental Mechanisms of Transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 276(29), 26733–26736. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100032200>
- Holford, N. C., Sandhu, H. S., Thakkar, H., Butt, A. N., & Swaminathan, R. (2008). Stability of β -actin mRNA in plasma. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1137, 108–111. <https://doi.org/10.1196/annals.1448.006>
- How does the CELLSEARCH® System work?: <http://www.cellsearchctc.com/about-cellsearch/how-cellsearch-ctc-test-works> (18. 7. 2020)
- Hunsley B.; Ryan W. L.; Fernando M. R. (2018) Compositions and methods for stabilizing circulating tumor cell. US 10091984B2.
- Iaconetti, C., Gareri, C., Polimeni, A., & Indolfi, C. (2013). Non-Coding RNAs: The “Dark Matter” of Cardiovascular Pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 19987–20018. <https://doi.org/10.3390/ijms141019987>

- Ilie, M., Hofman, V., Leroy, S., Cohen, C., Heeke, S., Cattet, F., Bence, C., Lalvée, S., Mouroux, J., Marquette, C.-H., & Hofman, P. (2018). Use of circulating tumor cells in prospective clinical trials for NSCLC patients – standardization of the pre-analytical conditions. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 56(6), 980–989. <https://doi.org/10.1515/cclm-2017-0764>
- Jaiswal, S., Jamieson, C. H. M., Pang, W. W., Park, C. Y., Chao, M. P., Majeti, R., Traver, D., van Rooijen, N., & Weissman, I. L. (2009). CD47 Is Upregulated on Circulating Hematopoietic Stem Cells and Leukemia Cells to Avoid Phagocytosis. *Cell*, 138(2), 271–285. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.046>
- Kang, Q., Henry, N. L., Paoletti, C., Jiang, H., Vats, P., Chinnaiyan, A. M., Hayes, D. F., Merajver, S. D., Rae, J. M., & Tewari, M. (2016). Comparative analysis of circulating tumor DNA stability In K3EDTA, Streck, and CellSave blood collection tubes. *Clinical Biochemistry*, 49(18), 1354–1360. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.03.012>
- Kim, K. M., Abdelmohsen, K., Mustapic, M., Kapogiannis, D., & Gorospe, M. (2017). RNA in extracellular vesicles. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 8(4), e1413. <https://doi.org/10.1002/wrna.1413>
- Kim, Y.-N., Koo, K. H., Sung, J. Y., Yun, U.-J., & Kim, H. (2012). Anoikis Resistance: An Essential Prerequisite for Tumor Metastasis. *International Journal of Cell Biology*, 2012, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/306879>
- Kodíček, M., Valentová, O., Hynek R. Biochemie: chemický pohled na biologický svět. 2. přepracované vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2018, xii, 393 s. ISBN 978-80-7592-013-3.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, 23(20), 4051–4060. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
- Liu, D. W.; Chen, S. T., Liu, H. P. (2005). Choice of endogenous control for gene expression in nonsmall cell lung cancer. *European Respiratory Journal*, 26(6), 1002–1008. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00050205>
- Lou, X.-L., Sun, J., Gong, S.-Q., Yu, X.-F., Gong, R., & Deng, H. (2015). Interaction between circulating cancer cells and platelets: clinical implication. *Chinese Journal of Cancer Research = Chung-Kuo Yen Cheng Yen Chiu*, 27(5), 450–460. <https://doi.org/10.3978/j.issn.1000-9604.2015.04.10>
- Luk, A., Ma, Y., Ding, P., Young, F., Chua, W., Balakrishnar, B., Dransfield, D., Souza, P. de, & Becker, T. (2017). CTC-mRNA (AR-V7) Analysis from Blood Samples—Impact of Blood Collection Tube and Storage Time. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), 1047. <https://doi.org/10.3390/ijms18051047>
- Ma, P., Pan, Y., Li, W., Sun, C., Liu, J., Xu, T., & Shu, Y. (2017). Extracellular vesicles-mediated noncoding RNAs transfer in cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 10(1), 57. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0426-y>
- Magnani, M., Galluzzi, L., & Bruce, I. J. (2006). The Use of Magnetic Nanoparticles in the Development of New Molecular Detection Systems. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6(8), 2302–2311. <https://doi.org/10.1166/jnn.2006.505>
- Matera, A. G., Terns, R. M., & Terns, M. P. (2007). Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(3), 209–220. <https://doi.org/10.1038/nrm2124>

- Mattick, J. S., & Makunin, I. V. (2006). Non-coding RNA. *Human Molecular Genetics*, *15*(suppl_1), R17–R29. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl046>
- Meng, S., Tripathy, D., Frenkel, E. P., Shete, S., Naftalis, E. Z., Huth, J. F., Beitsch, P. D., Leitch, M., Hoover, S., Euhus, D., Haley, B., Morrison, L., Fleming, T. P., Herlyn, D., Terstappen, L. W. M. M., Fehm, T., Tucker, T. F., Lane, N., Wang, J., & Uhr, J. W. (2004). Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clinical Cancer Research*, *10*(24), 8152–8162. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1110>
- Moring S. E.; Somack R. (1999) Methods of nucleic acid isolation. US 5972613A.
- Morris, K. V., & Mattick, J. S. (2014). The rise of regulatory RNA. *Nature Reviews Genetics*, *15*(6), 423–437. <https://doi.org/10.1038/nrg3722>
- Nagrath, S., Sequist, L. V., Maheswaran, S., Bell, D. W., Irimia, D., Utkus, L., Smith, M. R., Kwak, E. L., Digumarthy, S., Muzikansky, A., Ryan, P., Balis, U. J., Tompkins, R. G., Haber, D. A., & Toner, M. (2007). Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, *450*(7173), 1235–1239. <https://doi.org/10.1038/nature06385>
- New tube maintains EVs and cfRNA: <https://www.streck.com/blog/new-tube-maintains-evs-and-cfrna/> (3. 8. 2020)
- Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A., & Thiery, J. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, *166*(1), 21–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>
- Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, *1*(3), 1559–1582. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.236>
- Ozkumur, E., Shah, A. M., Ciciliano, J. C., Emmink, B. L., Miyamoto, D. T., Brachtel, E., Yu, M., Chen, P. I., Morgan, B., Trautwein, J., Kimura, A., Sengupta, S., Stott, S. L., Karabacak, N. M., Barber, T. A., Walsh, J. R., Smith, K., Spuhler, P. S., Sullivan, J. P., Sullivan, J. P., Lee, R. J., Ting, D. T., Luo, X., Shaw, A. T., Bardia, A., Sequist, L. V., Louis, D. N., Maheswaran, S., Kapur, R., Haber, D. A., Toner, M. (2013). Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells. *Science Translational Medicine*, *5*(179), 1–20. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005616>
- Palazzo, A. F., & Lee, E. S. (2015). Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Frontiers in Genetics*, *6*(JAN), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00002>
- Pantel, K., & Alix-Panabières, C. (2010). Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends in Molecular Medicine*, *16*(9), 398–406. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.07.001>
- PAXgene Blood RNA Tube (IVD): <https://www.preanalytix.com/products/blood/rna/-mirna/paxgene-blood-rna-tube-ivd/US?cHash=d30c7160bd2139487087b72f4198edaf> (18. 7. 2020)
- Peeters, D. J. E., De Laere, B., Van den Eynden, G. G., Van Laere, S. J., Rothé, F., Ignatiadis, M., Sieuwerts, A. M., Lambrechts, D., Rutten, A., van Dam, P. A., Pauwels, P., Peeters, M., Vermeulen, P. B., & Dirix, L. Y. (2013). Semiautomated isolation and molecular characterisation of single or highly purified tumour cells from CellSearch enriched blood samples using dielectrophoretic cell sorting. *British Journal of Cancer*, *108*(6), 1358–1367. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.92>

- Pös, O., Biró, O., Szemes, T., & Nagy, B. (2018). Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications. *European Journal of Human Genetics*, 26(7), 937–945. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0132-4>
- Qin, J., Alt, J. R., Hunsley, B. A., Williams, T. L., & Fernando, M. (2014). Stabilization of circulating tumor cells in blood using a collection device with a preservative reagent. *Cancer Cell International*, 14(1), 23. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-14-23>
- Qin, J., Williams, T. L., & Fernando, M. R. (2013). A novel blood collection device stabilizes cell-free RNA in blood during sample shipping and storage. *BMC Research Notes*, 6(1), 380. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-380>
- Rao, S. (2017). *Long Non Coding RNA Biology* (M. R. S. Rao (ed.); Vol. 1008). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-5203-3>
- Rejniak, K. A. (2012). Investigating dynamical deformations of tumor cells in circulation: predictions from a theoretical model. *Frontiers in Oncology*, 2(September), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00111>
- Riethdorf, S., Fritsche, H., Müller, V., Rau, T., Schindlbeck, C., Rack, B., Janni, W., Coith, C., Beck, K., Jänicke, F., Jackson, S., Gornet, T., Cristofanilli, M., & Pantel, K. (2007). Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: A validation study of the cell search system. *Clinical Cancer Research*, 13(3), 920–928. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1695>
- RNAgard® Blood: <https://www.biomatrica.com/product/rnagard-blood/#tab-downloads> (18. 7. 2020)
- Salway, F., Day, P., Ollier, W., & Peakman, T. (2008). Levels of 5' RNA tags in plasma and buffy coat from EDTA blood increase with time. *International Journal of Epidemiology*, 37(suppl_1), i11–i15. <https://doi.org/10.1093/ije/dym279>
- Schilling, D., Todenhöfer, T., Hennenlotter, J., Schwentner, C., Fehm, T., & Stenzl, A. (2012). Isolated, disseminated and circulating tumour cells in prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, 9(8), 448–463. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.136>
- Schwarzenbach, H., Hoon, D. S. B., & Pantel, K. (2011). Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer*, 11(6), 426–437. <https://doi.org/10.1038/nrc3066>
- Sequist, L. V., Nagrath, S., Toner, M., Haber, D. A., & Lynch, T. J. (2009). The CTC-Chip: An Exciting New Tool to Detect Circulating Tumor Cells in Lung Cancer Patients. *Journal of Thoracic Oncology*, 4(3), 281–283. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181989565>
- Shih, C.-L., Luo, J.-D., Chang, J. W.-C., Chen, T.-L., Chien, Y.-T., Yu, C.-J., & Chiou, C.-C. (2015). Circulating Messenger RNA Profiling with Microarray and Next-generation Sequencing: Cross-platform Comparison. *Cancer Genomics & Proteomics*, 12(5), 223–230. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26417025>
- Singh, C., & Roy-Chowdhuri, S. (2016). *Quantitative Real-Time PCR: Recent Advances* (Vol. 1392, pp. 161–176). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3360-0_15
- Snustad, D. P., Simmons M. J., Relichová, J, ed. Genetika. Druhé, aktualizované vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2017, xix, 844 s. ISBN 978-80-210-8613-5.

- Sorber, L., Zwaenepoel, K., Jacobs, J., De Winne, K., Goethals, S., Reclusa, P., Van Casteren, K., Augustus, E., Lardon, F., Roeyen, G., Peeters, M., Van Meerbeeck, J., Rolfo, C., & Pauwels, P. (2019). Circulating Cell-Free DNA and RNA Analysis as Liquid Biopsy: Optimal Centrifugation Protocol. *Cancers*, *11*(4), 458. <https://doi.org/10.3390/cancers11040458>
- Souza, M. F. de, Kuasne, H., Barros-Filho, M. D. C., Cilião, H. L., Marchi, F. A., Fuganti, P. E., Paschoal, A. R., Rogatto, S. R., & Cólus, I. M. de S. (2017). Circulating mRNAs and miRNAs as candidate markers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer. *PloS One*, *12*(9), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184094>
- Stark, R., Grzelak, M., & Hadfield, J. (2019). RNA sequencing: the teenage years. *Nature Reviews Genetics*, *20*(11), 631–656. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0150-2>
- Steinert, G., Schölch, S., Niemietz, T., Iwata, N., García, S. A., Behrens, B., Voigt, A., Kloor, M., Benner, A., Bork, U., Rahbari, N. N., Büchler, M. W., Stoecklein, N. H., Weitz, J., & Koch, M. (2014). Immune Escape and Survival Mechanisms in Circulating Tumor Cells of Colorectal Cancer. *Cancer Research*, *74*(6), 1694–1704. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1885>
- Stocum, D. L. (2012). An Overview of Regenerative Biology. In *Regenerative Biology and Medicine* (pp. 3–20). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384860-4.00001-0>
- Suckau, L., Fechner, H., Chemaly, E., Krohn, S., Hadri, L., Kockskämper, J., Westermann, D., Bisping, E., Ly, H., Wang, X., Kawase, Y., Chen, J., Liang, L., Sipo, I., Vetter, R., Weger, S., Kurreck, J., Erdmann, V., Tschöpe, C., Pieske, B., Lebeche, D., Schultheiss, H. P., Hajjar, R. J., Poller, W. C. (2009). Long-Term Cardiac-Targeted RNA Interference for the Treatment of Heart Failure Restores Cardiac Function and Reduces Pathological Hypertrophy. *Circulation*, *119*(9), 1241–1252. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.783852>
- Tempus™ Blood RNA Tube:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4342792?SID=srch-hj-4342792#/4342792?SID=srch-hj-4342792> (18. 7. 2020)
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, *139*(5), 871–890. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>
- Thiery, J. P., & Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *7*(2), 131–142. <https://doi.org/10.1038/nrm1835>
- Tsui, N. B. Y., Ng, E. K. O., & Lo, Y. M. D. (2002). Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clinical Chemistry*, *48*(10), 1647–1653. <https://doi.org/10.1093/clinchem/48.10.1647>
- Tuffaha, M. S. A. (2008). Phenotypic and Genotypic Diagnosis of Malignancies: An Immunohistochemical and Molecular Approach. Phenotypic and Genotypic Diagnosis of Malignancies: An Immunohistochemical and Molecular Approach. 1-284. [10.1002/9783527621521](https://doi.org/10.1002/9783527621521).
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., & Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Research*, *39*(16), 7223–7233. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr254>
- Tzimagiorgis, G., Michailidou, E. Z., Kritis, A., Markopoulos, A. K., & Koudou, S. (2011).

- Recovering circulating extracellular or cell-free RNA from bodily fluids. *Cancer Epidemiology*, 35(6), 580–589. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2011.02.016>
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
- Valadkhan, S. (2010). Role of the snRNAs in spliceosomal active site. *RNA Biology*, 7(3). <https://doi.org/10.4161/rna.7.3.12089>
- van der Toom, E. E., Verdone, J. E., Gorin, M. A., & Pienta, K. J. (2016). Technical challenges in the isolation and analysis of circulating tumor cells. *Oncotarget*, 7(38), 62754–62766. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11191>
- Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D., & Remaley, A. T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature Cell Biology*, 13(4), 423–433. <https://doi.org/10.1038/ncb2210>
- Visvader, J. E., & Lindeman, G. J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature Reviews Cancer*, 8(10), 755–768. <https://doi.org/10.1038/nrc2499>
- Wahl, M. C., Will, C. L., & Lührmann, R. (2009). The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell*, 136(4), 701–718. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.009>
- Wang, H., Stoecklein, N. H., Lin, P. P., & Gires, O. (2017). Circulating and disseminated tumor cells: diagnostic tools and therapeutic targets in motion. *Oncotarget*, 8(1), 1884–1912. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12242>
- Wang, L., Balasubramanian, P., Chen, A. P., Kummar, S., Evrard, Y. A., & Kinders, R. J. (2016). Promise and limits of the CellSearch platform for evaluating pharmacodynamics in circulating tumor cells. *Seminars in Oncology*, 43(4), 464–475. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2016.06.004>
- Williams, S. C. P. (2013). Circulating tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(13), 4861. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304186110>
- Wong, K. H. K., Tessier, S. N., Miyamoto, D. T., Miller, K. L., Bookstaver, L. D., Carey, T. R., Stannard, C. J., Thapar, V., Tai, E. C., Vo, K. D., Emmons, E. S., Pleskow, H. M., Sandlin, R. D., Sequist, L. V., Ting, D. T., Haber, D. A., Maheswaran, S., Stott, S. L., & Toner, M. (2017). Whole blood stabilization for the microfluidic isolation and molecular characterization of circulating tumor cells. *Nature Communications*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01705-y>
- Woodhouse, E. C., Chuaqui, R. F., & Liotta, L. A. (1997). General mechanisms of metastasis. *Cancer*, 80(8 Suppl), 1529–1537. <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/%28SICI%291097-0142%2819971015%2980%3A8%2B%3C1529%3A%3AAID-CNCR2%3E3.0.CO%3B2-F>
- Woolford, J. L., & Baserga, S. J. (2013). Ribosome Biogenesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 195(3), 643–681. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.153197>

- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R. M., Andreu, Z., Bedina Zavec, A., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., Gursel, M., Heegaard, N. H. H., Hednrix, A., Kierulf, P., Kokubun, K., Kosanovic, M., Kralj-Iglic, V., Krämer-Albers, E. M., Laitinen, S., Lässer, C., Lener, T., Ligeti, E., Linē, A., Lipps, G., Llorente, A., Lötval, J., Manček-Keber, M., Marcilla, A., Mittelbrunn, M., Nazarenko, I., Nolte-'t Hoen, E. N. M., Nyman, T. A., O'Driscoll, L., Olivan, M., Oliveira, C., Pállinger, É., del Portilo, H. A., Reventós, J., Rigau, M., Rohde, E., Sammar, M., Sánchez-Madrid, F., Santarém, N., Schallmoser, K., Stampe Ostenfeld, M., Stoorvogel, W., Stukelj, R., Van der Grein, S. G., Vasconcelos, M. H., Wauben, M. H. M., De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1), 27066. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
- Yap, K., Cohen, E. N., Reuben, J. M., & Khoury, J. D. (2019). Circulating Tumor Cells: State-of-the-art Update on Technologies and Clinical Applications. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 14(5), 353–357. <https://doi.org/10.1007/s11899-019-00531-x>
- Zhou, R., Chen, K. K., Zhang, J., Xiao, B., Huang, Z., Ju, C., Sun, J., Zhang, F., Lv, X.-B., & Huang, G. (2018). The decade of exosomal long RNA species: an emerging cancer antagonist. *Molecular Cancer*, 17(1), 75. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0823-z>
- Zkumavky s EDTA: <https://www.dialab.cz/k198-bezpecnostni-system-pro-odber-krve-a-moci-odbery-venozni-krve-odberove-zkumavky-vacuette-zkumavky-s-edta> (18. 7. 2020)